

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

DOUGLAS HERRERA MONTENEGRO

RNA DUPLA FITA EM *Guignardia citricarpa*: OBTENÇÃO, CURA, TRANSMISSÃO E
ALTERAÇÕES FENOTÍPICAS

CURITIBA

2010

DOUGLAS HERRERA MONTENEGRO

RNA DUPLA FITA EM *Guignardia citricarpa*: OBTENÇÃO, CURA, TRANSMISSÃO E
ALTERAÇÕES FENOTÍPICAS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas, área de concentração: Genética.

Orientadora: Prof. Dra. Vanessa Kava-Cordeiro

CURITIBA

2010

À Prof. Dra. Vanessa Kava-Cordeiro

Dedico

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que tornaram possível e colaboraram com a realização deste trabalho.

Aos meus pais, Diogenes Dantas Montenegro Filho e Tânia Mara Herrera Montenegro, que proporcionaram meus estudos e me deram a oportunidade para eu fazer parte da Universidade Federal de Paraná, o que sempre foi motivo de muito orgulho para mim.

Ao meu irmão, Guilherme Herrera Montenegro, pela “compreensão”, novamente.

A toda minha família, por sempre me incentivar a dar um passo além e me ensinar a priorizar minha educação.

À Lili, minha namorada que amo muito, que sempre esteve comigo compartilhando meus dramas, incentivando-me e torcendo para que tudo desse certo.

À Carol Silvano, Thabata Alvarez e Vanessa Zulkiewicz, pela grande amizade, por acreditarem no trabalho e por escolherem fazer suas iniciações científicas me acompanhando. Sem a ajuda de vocês, essa dissertação estaria incompleta.

À Lis, minha amiga querida que desde a graduação esteve junto comigo, e que apesar de trocarmos farpas algumas vezes, já está deixando muitas saudades.

À Andressa Bini, ao Douglas Adamoski e à Mariana Ogg, meus amigos graduandos, com quem muito aprendi, pela grande amizade em todos os momentos, pelas críticas construtivas, e por algumas vezes dispensarem tempo e energia se dispondo a me ajudar.

Aos amigos da pós-graduação, Angela Ikeda, Carol Waculicz, Danyelle Stringari, Eduardo Lemons, Fabiana Tonial, Henrique Gomes, Josiane Figueiredo, Renata Rodrigues e Sheniam Bom, por me acompanharem durante o cumprimento de créditos e tornarem as disciplinas mais divertidas.

Aos amigos do laboratório, Allan, Arthur, Camila, Daiani, Devânia, Eduardo, Elisandro, Felipe, Josiele, Juliana Fabris, Juliana Marta, Micheli, Natália, Patrícia, Rodrigo Schuh e Yuri, pela convivência ao longo de toda minha estadia no LabGeM.

À Dona Isolde Gaertner, por todos os serviços prestados ao laboratório, pela amizade, carinho e por sempre me trazer um cafezinho no meio da tarde.

À professora Patrícia Dalzoto, por já acompanhar minha vida acadêmica ao longo de cinco anos, pela amizade dentro e fora da sala de aula e pela ajuda com os testes estatísticos.

Às professoras Chirlei Glienke e Lygia V. Galli-Terasawa, pelo exemplo profissional de liderança no laboratório e por fazerem o LabGeM funcionar.

À professora Vanessa Kava-Cordeiro, por acreditar em mim desde 2005, quando comecei a estagiar sob sua orientação, pela grande amizade, incentivos e puxões de orelha, e por ser a maior responsável pela concretização deste trabalho e do meu mestrado.

“O mundo é um contínuo marulhar.
Pequenos peixes cantam e dançam, nadam
espertamente ao sabor das ondas que vêm e vão.
Quem no entanto é capaz de saber o que se passa
nas recônditas profundezas desse mar sem fim?
Quem algum dia já mediu sua exata profundidade?”

Eiji Yoshikawa, em Musashi

RESUMO

Guignardia citricarpa é um ascomiceto de extrema importância para a citricultura brasileira, pois é o agente causal da Mancha Preta dos Citros. Alguns isolados desta espécie apresentam infecção por vírus de RNA dupla fita (RNAdf) com efeitos fenotípicos ainda desconhecidos. No presente estudo, sete isolados de *G. citricarpa*, previamente identificados como portadores de RNAdf, foram estudados. Estes isolados foram obtidos de 1996 a 2008, sendo um proveniente do estado do Paraná, cinco de São Paulo e um da África do Sul. Diferentes protocolos de purificação de RNAdf foram investigados e o melhor rendimento foi com a utilização de fenol ácido (pH 4,7). Uma das formas de se analisar a influência do RNAdf é através da obtenção de linhagens isogênicas, que diferem entre si pela presença ou ausência de RNAdf. Com o objetivo de obtenção de linhagens isogênicas, dois protocolos de cura do RNAdf e um de transmissão de RNAdf foram utilizados. Para a cura, foi feito o repique em meio com ciclohexamida, conforme relatado na literatura. Para *G. citricarpa* este método não foi eficiente, pois o fungo teve seu crescimento completamente inibido mesmo em baixas concentrações (0,5 µg/mL). Outro protocolo de cura utilizado foi repique de pontas de hifas em condições de cultura a 35°C, ao invés da cultura a 28°C, criando uma condição de estresse térmico para o fungo. Dos sete isolados investigados, apenas três apresentaram crescimento nestas condições. Destes, dois isolados produziram onze setores que foram investigados quanto à presença de RNAdf. Em nove não foram observadas bandas de RNAdf após eletroforese de gel de agarose. Neste momento, estes foram considerados curados do RNAdf. Para a transmissão, foi necessário selecionar isolados de *G. citricarpa* com características que os diferenciasssem, além da presença/ausência de RNAdf. Isolados foram investigados quanto ao padrão de bandas de RAPD, porém, não foi possível diferenciá-los. Optou-se por utilizar uma característica morfológica, a presença ou ausência de halo amarelo em meio aveia. Os isolados com RNAdf são positivos para esta característica. Foram selecionados doze isolados de *G. citricarpa* sem RNAdf, negativos para esta característica. Após avaliar a compatibilidade destes isolados com um isolado com RNAdf, experimentos de transmissão foram conduzidos. 27 colônias que não formaram halo em meio aveia, provenientes de conídios da área de contato entre os isolados, foram investigadas quanto à presença de RNAdf e 7 delas (28,92%) receberam RNAdf. As linhagens isogênicas foram investigadas quanto à morfologia da colônia e foi possível verificar que as linhagens com RNAdf apresentam um menor diâmetro da colônia após 15 dias de cultura. Testes estatísticos comprovaram esta observação. Com o objetivo de sequenciar o genoma deste vírus, foi aperfeiçoado o protocolo de obtenção de seu cDNA. Este foi obtido e nas próximas etapas desta pesquisa, deverá ser sequenciado. Esta sequência servirá para completar a análise filogenética de vírus da família Totiviridae realizada neste trabalho. Os respectivos fungos hospedeiros destes vírus também foram enquadrados filogeneticamente por meio de sequências da região ITS1-5,8S-ITS2. No entanto, a análise dessa região não forneceu indícios de co-evolução entre vírus e hospedeiro.

PALAVRAS-CHAVE: *Guignardia citricarpa*, RNA dupla fita, isogenia, cura, transmissão.

ABSTRACT

Guignardia citricarpa is an ascomycete of extreme importance for the Brazilian citrus culture, since it's the causal agent of Citrus Black Spot. Some isolates of this species are infected with a double stranded RNA virus (dsRNA), which causes unknown phenotypical symptoms, yet. Seven isolates from this species previously identified as bearing dsRNA, were studied. These isolates were obtained from 1996 to 2008, one from the state of Paraná, five from the state of São Paulo and one from South Africa. Different dsRNA purification protocols were investigated and the best dsRNA yield was made with the use of acid phenol (pH 4,7). One of the ways to analyze the influence of dsRNA is through isogenic strains, which differ from one another by the presence or absence of this genetic material. Two cure and one transmission protocol were used for the obtainment of isogenic strains. Regarding the cure experiment, cycloheximide was added to the medium where mycelial plugs were placed, as described in the literature. This method wasn't efficient for *G. citricarpa* because the fungal growth was completely inhibited, even when 0,5 µg/mL of the compound was used. The other cure protocol consisted of growth of hyphal tip sections at 35 °C, instead of 28 °C, which is a stressing condition. From the seven isolates submitted to this treatment, only three managed to grow at these conditions. From these, only two produced eleven sectors which were investigated regarding the presence of dsRNA. In nine, no dsRNA bands were observed in agarosis gel after electrophoresis. At this moment they were considered cured from the dsRNA. For the transmission of dsRNA, it was necessary to select *G. citricarpa* isolates with some characteristics that would allow their differentiation from other strains, besides from the presence/absence of dsRNA. Isolates were investigated regarding their RAPD banding pattern, however, they were all the same. It was opted to use a morphological characteristic, the presence or absence of a yellow halo in oatmeal medium. All isolates with dsRNA are positive for this characteristic, and twelve isolates with no dsRNA and negative for the halo were chosen. After hyphal compatibility was assessed on these isolates, by pairing a dsRNA bearing isolate with a dsRNA-free one, transmission experiments were performed. Twenty seven colonies that didn't present the yellow halo in oatmeal medium, all of which came from conidia from the contact zone between isolates, were investigated for the presence of dsRNA and seven of them (28,92%) received this molecule. Isogenic strains were then tested for colony morphology and it was possible to verify that dsRNA bearing strains had a significant smaller size after fifteen days of growth. Statistical analysis corroborated this trait. Aiming to sequence this viral genome, the cDNA production protocol was optimized. This molecule was yielded and in the next phases of this research, should be sequenced. This sequence will allow completing the phylogenetic analysis of viruses from the Totiviridae family performed in this study. The respective fungal hosts of these viruses were also phylogenetically grouped by their ITS1-5,8S-ITS2 region sequences, in order to identify a co-evolutive trait among these viruses and their hosts. However, the analysis of this region didn't provide evidences of this relation.

KEYWORDS: *Guignardia citricarpa*, double stranded RNA, isogeny, cure, transmission

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

QUADRO 1	FUNGOS FITOPATOGÊNICOS COM RNAdf.....	27
QUADRO 2	PRESENÇA DE RNAdf, HALO, ANO E PROCEDÊNCIA DOS ISOLADOS DE <i>G. citricarpa</i> UTILIZADOS NO TRABALHO.....	32
QUADRO 3	SEQUÊNCIAS DOS “PRIMERS” UTILIZADOS NO RAPD.....	44
FIGURA 1	ÁCIDOS NUCLÉICOS TOTAIS DO ISOLADO PC33/05 OBTIDOS COM FENOL E 2-MERCAPTOETANOL.....	47
FIGURA 2	ÁCIDOS NUCLÉICOS TOTAIS DO ISOLADO PC33/05.....	48
QUADRO 4	QUANTIFICAÇÃO DE DNA GENÔMICO E RNA DUPLA-FITA...	49
FIGURA 3	ÁCIDOS NUCLÉICOS TOTAIS DO ISOLADO PC33/05 TRATADOS COM DNASE E NUCLEASE S1.....	49
QUADRO 5	QUANTIFICAÇÃO E ESTIMATIVA DO TAMANHO DA BANDA DE RNA DUPLA-FITA DE PC33/05.....	50
QUADRO 6	RESULTADOS DO EXPERIMENTO DE CURA APÓS ESTRESSE TÉRMICO E REPIQUES DE PONTAS DE HIFA PARA TODOS OS ISOLADOS TESTADOS.....	53
FIGURA 4	MORFOLOGIA DO ISOLADO ECLaP APÓS 21 DIAS A 35° C....	54
FIGURA 5	MORFOLOGIA DO ISOLADO ECLaP.....	54
FIGURA 6	MORFOLOGIA DO ISOLADO PC7LD6 CULTIVADO A 35 °C POR 21 DIAS.....	54
FIGURA 7	ELETROFORESE DOS ÁCIDOS NUCLÉICOS TOTAIS DOS SETORES DO ISOLADO PC7LD6.....	55
FIGURA 8	ELETROFORESE DOS ÁCIDOS NUCLÉICOS TOTAIS DOS SETORES DO ISOLADO ECLaP.....	55
FIGURA 9	TAMANHO DA COLÔNIA DOS ISOLADOS SELVAGENS E RESPECTIVOS SETORES, APÓS 15 DIAS DE CULTURA.....	56
FIGURA 10	TESTE DE COMPATIBILIDADE VEGETATIVA ENTRE ISOLADOS DE <i>Guignardia</i> sp.....	59
FIGURA 11	TESTE DE COMPATIBILIDADE ENTRE ISOLADOS DE <i>G. citricarpa</i>	59
FIGURA 12	ENSAIO COMPATIBILIDADE ENTRE ISOLADOS	61

FIGURA 13	COLÔNIAS MONOSPÓRICAS OBTIDAS ENTRE PC33/05 E FTMI2.5.....	62
FIGURA 14	COLÔNIAS REPICADAS EM MEIO AVEIA PARA AVALIAÇÃO DO MARCADOR MORFOLÓGICO.....	62
FIGURA 15	ÁCIDOS NUCLÉICOS TOTAIS DOS ISOLADOS QUE NÃO APRESENTARAM HALO.....	63
FIGURA 16	TAMANHO DA COLÔNIA DOS ISOLADOS SELVAGENS E RESPECTIVAS COLÔNIAS QUE RECEBERAM O VÍRUS, APÓS 15 DIAS DE CRESCIMENTO.....	64
FIGURA 17	PRODUÇÃO DE cDNA APÓS RT-PCR DE RNAdf DE <i>G. citricarpa</i>	67
QUADRO 7	NOMENCLATURA DOS INDIVÍDUOS UTILIZADOS PARA ANÁLISE FILOGENÉTICA.....	69
FIGURA 18	ÁRVORE FILOGENÉTICA DE PARCIMÔNIA CONSTRUÍDA A PARTIR DO ALINHAMENTO DA SEQUÊNCIA DE NUCLEOTÍDEOS DA ORF PROTEÍNA DO CAPSÍDEO.....	70
FIGURA 19	ÁRVORE FILOGENÉTICA DE PARCIMÔNIA CONSTRUÍDA A PARTIR DO ALINHAMENTO DAS SEQUÊNCIAS DE AMINOÁCIDOS DAS PROTEÍNAS DO CAPSÍDEO.....	70
FIGURA 20	ÁRVORE FILOGENÉTICA DE PARCIMÔNIA CONSTRUÍDA A PARTIR DO ALINHAMENTO DAS SEQUÊNCIAS DE NUCLEOTÍDEOS DAS ORFS RNA POLIMERASES DEPENDENTES DE RNA.....	71
FIGURA 21	ÁRVORE FILOGENÉTICA DE PARCIMÔNIA CONSTRUÍDA A PARTIR DO ALINHAMENTO DA SEQUÊNCIA DE AMINOÁCIDOS DAS RNA POLIMERASES DEPENDENTES DE RNA.....	71
FIGURA 22	ÁRVORE FILOGENÉTICA DE PARCIMÔNIA CONSTRUÍDA A PARTIR DO ALINHAMENTO DAS REGIÕES 1ITS-5,8S-2ITS DE FUNGOS PORTADORES DE TOTIVIRUS.....	73

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	RESULTADOS DOS EXPERIMENTOS DE TRANSMISSÃO.....	63
----------	---	----

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	14
1.1	OBJETIVO GERAL.....	15
1.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	15
2	REVISÃO DA LITERATURA.....	16
2.1	FUNGOS FITOPATOGÊNICOS.....	16
2.2	OS GÊNEROS <i>Guignardia</i> E <i>Phyllosticta</i>	17
2.3	MANCHA PRETA DOS CITROS.....	19
2.4	RNA DUPLA-FITA.....	21
2.4.1	Origem e evolução de vírus.....	22
2.4.2	Taxonomia de micovírus de RNAdf.....	23
2.4.3	Genômica e fisiologia de vírus de RNAdf.....	24
2.4.4	Cura, transmissão e influência do RNAdf no hospedeiro.....	28
2.4.5	Silenciamento gênico e vias de RNA interferência.....	30
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	32
3.1	MATERIAL BIOLÓGICO.....	32
3.2	MEIOS DE CULTURA.....	33
3.2.1	Meio completo (MC).....	33
3.2.2	Meio citros.....	33
3.2.3	Meio aveia.....	34
3.3	SOLUÇÕES E TAMPÕES.....	34
3.3.1	Tampão de extração de DNA.....	34
3.3.2	Solução Tris-HCl pH 8,0.....	34
3.3.3	Solução salina.....	35
3.3.4	Solução EDTA 0,5 M pH 8,0.....	35
3.3.5	SDS 20%.....	35
3.3.6	Fenol.....	35
3.3.7	Acetato de sódio pH 4,7.....	36
3.3.8	Clorofane.....	36
3.3.9	Clorofil.....	36
3.3.10	Tampão EBA.....	36
3.3.11	Tampão STE.....	36
3.3.12	Tampão de amostra (“gel loading buffer”).....	37
3.3.13	Tampão TBE 5X.....	37
3.3.14	Solução de brometo de etídio.....	37
3.3.15	Solução de gelred.....	38
3.3.16	DNase.....	38
3.3.17	Nuclease S1.....	38
3.3.18	Solução de ciclohexamida.....	38
3.3.19	Solução de Tween 80.....	39
3.3.20	Solução de vitaminas.....	39
3.4	PREPARO DO MATERIAL.....	39
3.4.1	Esterilização.....	39
3.4.2	Extração de ácidos nucléicos totais.....	40
3.4.2.1	Extração de ácidos nucléicos totais com fenol pH 8,0.....	40
3.4.2.2	Extração de ácidos nucléicos totais com fenol pH 4,7.....	41
3.4.2.3	Extração de ácidos nucléicos totais com 2-mercaptoetanol.....	41
3.4.2.4	Viral nucleic acid extraction kit.....	42
3.4.2.5	Axyprep multisource total RNA miniprep kit.....	42

3.4.3	Eletroforese.....	42
3.4.4	Cura RNAdf.....	42
3.4.5	Caracterização dos isolados com e sem vírus.....	43
3.4.6	Transmissão horizontal de RNAdf.....	44
3.4.7	Comparação da morfologia e crescimento radial de linhagens isogênicas.....	45
3.4.8	Produção de cDNA.....	45
3.4.9	Filogenia.....	46
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	47
4.1	COMPARAÇÃO DOS DIFERENTES PROTOCOLOS DE EXTRAÇÃO DE ÁCIDOS NUCLÉICOS TOTAIS.....	47
4.2	COMPARAÇÃO DAS LINHAGENS ISOGÊNICAS	51
4.2.1	Cura do RNAdf em <i>G. citricarpa</i>.....	51
4.2.1.1	Ciclohexamida.....	51
4.2.1.2	Repique de pontas de hifa em cultura 35 °C.....	53
4.2.2	Transmissão de RNAdf entre linhagens.....	58
4.3	OBTENÇÃO DE cDNA.....	67
4.4	ANÁLISE DE SEQUÊNCIAS DE NUCLEOTÍDEOS E AMINOÁCIDOS DE GENES DE VÍRUS DA FAMÍLIA TOTIVIRIDAE.....	68
5	CONCLUSÕES.....	75
6	REFERÊNCIAS.....	76
7	APÊNDICES.....	88

1. INTRODUÇÃO

A espécie fúngica *Guignardia citricarpa* é considerada fitopatogênica, pois é normalmente encontrada como causadora da Mancha Preta de Citrus (MPC), uma doença que acomete plantas cítricas e possui grande importância econômica para o Brasil. Recentemente, foi relatada a infecção por vírus de RNA dupla-fita (RNA_{df}) em isolados dessa espécie.

Micovírus estão amplamente difundidos em fungos fitopatogênicos e, geralmente, são associados com infecções latentes em seus hospedeiros. Os sintomas induzidos por esses vírus parecem variar de severos até nulos na fisiologia de fungos, e podem levar à atenuação (hipovirulência) ou intensificação (hipervirulência) de sua virulência.

Os micovírus de RNA_{df} são divididos em cinco famílias: Hypoviridae, Totiviridae, Partitiviridae, Chrysoviridae e Reoviridae. Essas famílias são diferenciadas entre si principalmente por meio da caracterização de seus capsídeos protéicos e polimerases, quantidade de segmentos de genoma e hospedeiro, considerando que diferentes famílias de micovírus podem estar infectando o mesmo indivíduo. Alguns estudos recentes mostram que é possível que vírus de RNA_{df} estejam envolvidos em vias de RNA-interferência (silenciamento gênico ou degradação de mRNA) dos genes de virulência do fungo.

Em relação à agricultura, micovírus tem muito a contribuir como agentes de controle biológico de pragas, como já observado na espécie *Cryphonectria parasitica*. Há evidências de seu papel como responsável pela debilitação de espécies de fungos fitopatogênicos como *Helminthosporium victoriae*, *Sclerotinia sclerotiorum* e *Botrytis cinerae*.

Estudos de caracterização, transferência entre isolados, sequenciamento e cura destes RNA_{df} são importantes para se descobrir a influência destes em *G. citricarpa* e possivelmente avaliar seu potencial de biocontrole.

1.1 OBJETIVO GERAL

- Contribuir para o conhecimento de relação vírus e fungo em *G. citricarpa*

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Aperfeiçoar protocolos de extração de ácidos nucléicos totais para obtenção de RNAdf de *G. citricarpa*
- Desenvolver e validar métodos de cura de RNAdf para *G. citricarpa*
- Avaliar possíveis alterações morfológicas entre isolados submetidos ao protocolo de cura em relação aos portadores do RNAdf
- Promover a transmissão de RNAdf entre isolados geneticamente compatíveis de *G. citricarpa*
- Avaliar possíveis alterações morfológicas entre isolados que receberam o vírus por anastomose e seus respectivos fenótipos selvagens
- Validar um protocolo de obtenção de cDNA para o RNAdf de *G. citricarpa*
- Caracterizar filogeneticamente os micovírus da família Totiviridae disponíveis no Genbank comparando com o padrão filogenético de seus hospedeiros

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 FUNGOS FITOPATOGÊNICOS

Ainda não existe uma distinção exata entre microrganismos epifíticos, endofíticos e fitopatogênicos. Um microrganismo epifítico pode ser encontrado, eventualmente, dentro de um vegetal. Um endofítico, em certas condições, pode se tornar um patógeno e um patógeno pode não afetar seu hospedeiro, e assim ser considerado endofítico (AZEVEDO, 1998).

O sucesso nas etapas de colonização e infecção de plantas por fungos fitopatogênicos depende das habilidades do fungo em utilizar as fontes de nutrientes disponíveis na planta, penetrar nesta e também evitar seus mecanismos de defesa. Estudos com alguns fungos, mutantes para determinadas vias metabólicas, mostraram que estes devem apresentar diferentes estratégias de infecção e colonização já que mantiveram seu potencial patogênico, enquanto que alguns mutantes perderam a sua patogenicidade (SOLOMON, TAN e OLIVER, 2003).

O sucesso da penetração na planta hospedeira pela maioria dos fungos, patogênicos ou não, depende da diferenciação do micélio em estruturas especializadas, denominadas apressórios (KUBO *et al.*, 1996). Algumas espécies de *Colletotrichum*, *Magnaporthe* e *Phyllosticta* produzem apressório complexo e fortemente pigmentado com melanina (SHAW, KUO, e HOCH, 1998). Este pigmento media a formação de uma pressão hidrostática essencial para a ação mecânica do apressório (HOWARD e FERRARI, 1989; BOURETT e HOWARD, 1990). O tratamento de conídios com inibidores de síntese de melanina como Triciclazol e Piroquilon, resulta na produção de apressórios não pigmentados e não funcionais, acarretando a incapacidade do fungo penetrar na planta (WOLOSHUK e SISLER, 1982; BELL e WHEELER, 1986; DEAN, 1997).

O uso de testes morfológicos e moleculares foi bem sucedido em diferenciar fungos isolados tanto de plantas cítricas sadias como sintomáticas para a Mancha Preta de Citrus (MPC). Foi possível classificar os isolados, por marcadores RAPD, como pertencentes às espécies *Guignardia citricarpa*, *G. magniferae* e *Phyllosticta spinarum*. O fato de haver alta similaridade genética entre indivíduos de *G.*

mangiferae e um isolado patogênico de goiaba indica que a mesma espécie pode ser endofítica num hospedeiro e patogênica em outro (STRINGARI *et al.*, 2009).

O uso de marcadores morfológicos (taxa de crescimento e caracterização de conídios) e moleculares, como sequenciamento da região do DNA ribossomal ITS1-5,8S-ITS2 (“Internal Transcribed Spacer regions of ribosomal DNA”), PCR espécie-específica e RAPD possibilitou a diferenciação de diferentes isolados de *Colletotrichum* em *C. boninense* e *C. gloesporioides*, todos isolados de *Maytenus ilicifolia*, uma planta medicinal conhecida popularmente como espinheira-santa (PILLEGI *et al.*, 2009)

Diferentes estratégias são utilizadas para identificar a rota de infecção de fungos fitopatogênicos. Um protocolo de transformação para o fungo *Cochliobolus heterostrophus*, patogênico de milho, utiliza o gene GFP (“Green Fluorescent Protein”) como marcador. Um isolado de *C. heterostrophus* transformado foi utilizado para infectar uma planta sadia e acompanhar o desenvolvimento da infecção (MAOR *et al.*, 1998).

Recentemente, foi descrita uma estratégia de transformação de *G. citricarpa* com *Agrobacterium tumefaciens*, ATMT (*Agrobacterium tumefaciens mediated transformation*), utilizando o gene GFP. As linhagens transformantes permaneceram mitoticamente estáveis, e concluiu-se que o uso de ATMT é uma ferramenta poderosa para se estudar a genômica funcional de fungos filamentosos, além de aumentar o escopo do estudo da relação entre patógenos e hospedeiros (FIGUEIREDO *et al.*, 2010).

2.2 OS GÊNEROS *Guignardia* E *Phyllosticta*

O gênero *Guignardia*, descrito em 1892 por Viala e Ravaz, compreende as formas teleomórfas de espécies de *Phyllosticta* e de alguns outros gêneros relacionados de fungos mitospóricos geralmente saprófitos ou semiparasitas de folhas (SIVANESAN, 1984).

Diversos autores isolaram espécies de *Phyllosticta* de plantas aparentemente saudáveis, descrevendo-as como endofíticas (CARROLL e CARROLL, 1978; PETRINI, 1986; LEUCHTMANN *et al.*, 1992; GLIENKE, 1995; PENNA, 2000). No entanto

existe um grande número de relatos citando este gênero como fitopatogênico de diversas culturas com grande importância econômica como arroz (SUGHA, SINGH e SHARMA, 1986), cana-de-açúcar (PONS, 1990), tabaco (PATEL, PATEL e TILVA, 1988), eucalipto (CROUS *et al.*, 1993) e também frutíferas como abacate, tomate, manga, mamão, uva (IBRAHIM e BAYCA, 1989), e principalmente em citros (McONIE, 1964a, 1964b; HERBERT e GRECH, 1985; JOHNSTON e FULLERTON, 1988; STRINGARI *et al.*, 2009).

A separação de espécies em *Phyllosticta* é baseada principalmente no hospedeiro de onde é isolado e, menor importância é dada a características como sintomatologia e estruturas morfológicas (picnídio, conídio e micélio) (VAN DER AA, 1973).

Fungos do gênero *Guignardia* (anamorfo: *Phyllosticta*) foram isolados de folhas sadias de plantas da família Ericaceae. Morfologicamente, o anamorfo *Phyllosticta*, apresentou-se muito semelhante à espécie *P. capitalensis* P. Henn., conhecido como patógeno de orquídeas. Dados de sequenciamento de regiões ITS1 e ITS2 incluindo 5,8S rDNA, demonstraram a identidade dos isolados com *P. capitalensis*. Com estes resultados, os autores descreveram o endofítico ascomiceto como a nova espécie *Guignardia endophyllicola*, cujo anamorfo correspondente é *Phyllosticta capitalensis*. Previamente descrito apenas como patógeno de orquídeas, este fungo foi comprovadamente identificado como endofítico de plantas da família Ericaceae (OKANE, NAKAGIRI e ITO, 2001). Outros autores caracterizaram linhagens de *Phyllosticta* isoladas de folhas de árvores tropicais por meio de análise de ITS-RFLP e sequenciamento de regiões ITS e identificaram estes isolados como *P. capitalensis*. Desta forma, comprovaram que este fungo, apesar de inicialmente descrito como patógeno de orquídeas, pode ser encontrado como endofítico de várias espécies vegetais (PANDEY, REDDY e SURYANARAYANAN, 2003).

Dezenas de linhagens patogênicas e endofíticas de *Guignardia* spp, *Phyllosticta* spp e *G. citricarpa* isoladas de diferentes espécies vegetais de diversas regiões da Ásia, África, Austrália e América foram comparadas. Os autores utilizaram dados morfológicos e também moleculares (sequências ITS e AFLP) para este estudo. Linhagens patogênicas apresentam crescimento lento em comparação com linhagens endofíticas, que apresentam crescimento mais rápido e fácil produção de peritécio e ascósporos em meio de cultura. Com os dados moleculares foi possível agrupar os isolados estudados em quatro grupos. Os grupos I e II foram

os mais numerosos, sendo que no grupo I ficaram os isolados (38 no total) de lesão de citros (MPC), com crescimento mais lento e que foram então, identificados como *G. citricarpa*. No grupo II (43 isolados), os dados moleculares apontaram para uma grande identidade destes isolados com o fungo *G. mangiferae*, sendo que estes isolados eram provenientes de citros e também de outras plantas assintomáticas ou com sintomas bem discretos (pequenas manchas). Com base nestes dados, estes isolados foram classificados como *Guignardia mangiferae*. Os grupos III e IV apresentaram apenas um isolado cada e os dados moleculares apontaram para as espécies *Phyllosticta telopeae* e *P. spinarum*, respectivamente (BAAYEN *et al.*, 2002).

A variabilidade genética de linhagens endofíticas e patogênicas do fungo *Guignardia* spp, isoladas em diversos países e hospedeiros, através de marcadores RAPD, foi analisada. Neste estudo, também foi relatada a existência de, pelo menos, três espécies distintas de *Guignardia*, morfologicamente muito semelhantes, co-existindo em *Citrus* spp. O autor sugere que as linhagens isoladas de lesões de MPC pertencem à espécie *G. citricarpa*, enquanto as linhagens endofíticas isoladas de *Citrus* spp devem pertencer à espécie *G. mangiferae* (CHRISTO, 2002).

Dados moleculares foram utilizados para diferenciar isolados pertencentes às espécies *G. citricarpa*, *G. mangiferae* e *Phyllosticta spinarum*. Quatro populações distintas foram formadas após realização de AMOVA. Este fato revela a dificuldade de se diferenciar isolados dentro dessas espécies, como foi sugerido pelos autores (STRINGARI *et al.*, 2009).

2.3 MANCHA PRETA DE CITROS

A citricultura brasileira, em 2006, foi responsável pela exportação de 2 bilhões de dólares em suco de laranja e alcançou um domínio de 81% de todo esse mercado internacional. Apesar da grande importância econômica e social que representa a citricultura para o país, este setor ressen-te-se de vários problemas de natureza fitossanitária e vem sofrendo com o avanço de pragas naturais. Desde 1990, a área plantada diminuiu 21%. Um grave problema que ajuda a aumentar o prejuízo decorre da Mancha Preta de Citros, uma doença que ocasiona o surgimento

de lesões superficiais em frutos e prejudica a exportação brasileira de laranja “in natura” (SALOMÃO, 2007).

O primeiro relato da doença foi descrito em 1895 na Austrália, ocasionando elevadas perdas na produção e pós-colheita. Por volta da década de 30, a enfermidade foi encontrada na região litorânea da província de Transvaal, tornando impróprios para a exportação mais de 90% dos frutos de pomares não protegidos (ROBBS, 1990). Hoje a MPC apresenta uma ampla distribuição geográfica, registrada na África, Ásia, Oceania, América Central, América do Sul e Antilhas (ROBBS e BITTENCOURT, 1995).

Recentemente, em abril de 2010, a preocupação de citricultores do estado da Florida, nos Estados Unidos da América, aumentou com a chegada da MPC em seus pomares, pois sua ocorrência foi reconhecida pelo governo estadunidense. Alguns pesquisadores já verificaram que frutas da região estão infectadas com a doença e expressam preocupação com a falta de medidas eficientes para o controle da doença (BOUFFARD, 2010).

No Brasil, o primeiro relato da doença ocorreu em 1940, em frutos coletados em Piracicaba, São Paulo. Em 1980 a doença ressurgiu no Rio de Janeiro, afetando Mexerica do Rio (ROBBS, PIMENTEL e RIBEIRO, 1980). No início da década de 90 a MPC foi identificada atingindo o município de Conchal, uma importante região citrícola do Estado de São Paulo (GOES e FEICHTENBERGER, 1993). A evolução e a distribuição geográfica da MPC ocorreram de forma muito rápida, e encontrou-se, de forma endêmica, em mais de quarenta municípios produtores do Estado de São Paulo (BALDASSARI *et al.*, 2001).

As medidas de controle incluem, basicamente, a erradicação de plantas e frutos afetados e a proteção de pomares sadios. Quanto às medidas de erradicação, sugere-se a eliminação dos frutos afetados antes do início da florada, suprimindo a principal fonte de inóculo representada pelos picnídios (ROBBS e BITTENCOURT, 1995).

O controle químico com fungicidas, além de antieconômico, não é totalmente eficaz contra a doença. Porém, é necessário recorrer a este recurso quando a MPC ataca de forma severa e quando a produção destina-se ao consumo da fruta fresca (SPÓSITO, 1999). O principal problema da utilização sucessiva destes produtos é a seleção de linhagens resistentes, conforme observado na África do Sul (HERBERT e GRECH, 1985).

A espécie *G. citricarpa* foi capaz de crescer em meio de cultura mesmo após adição do fungicida estrolilurina (10 µg/µL), apesar de apresentar uma redução na taxa de esporulação, quando comparada com linhagens cultivadas sem esse composto. Quando linhagens do fungo foram testadas com benomil, até uma concentração de apenas 0,5 µg/µL foi capaz de parar o crescimento micelial de 90% das colônias testadas (POSSIEDE *et al.*, 2009).

2.4 RNA DUPLA-FITA

Em 1948, os irmãos La France perceberam que alguns fungos da espécie *Agaricus bisporus* tinham corpos de frutificação malformados, o que causava grandes perdas na produção destes cogumelos. A presença de pelo menos três tipos de VLPs (“Virus Like Particles”, ou partículas semelhantes a vírus) nos esporóforos de cogumelos doentes desta espécie foi considerada como o evento que marca o nascimento da micovirologia (HOLLINGS, 1962).

Os trabalhos pioneiros em relação à RNAdf mostram que, em *Saccharomyces cerevisiae*, há duas bandas em gel de eletroforese que correspondem a esse ácido nucléico pois resistem a tratamentos com DNase e são sensíveis quando RNase é utilizada. Esses RNAdf estão associados ao fenótipo “killer” do fungo (secreção de toxina e resistência a essa toxina) além de apresentarem segregação não-mendeliana (SWEENEY, TATE e FINK, 1976). Os autores também consideraram que esses RNAdf correspondem a plasmídeos destes microrganismos.

Foi relatada a presença de um micovírus em *Aspergillus foetidus* composto de três RNAdf: RNAdf 1, RNAdf 2 e RNAdf 3. A transcrição neste vírus obedece a um padrão semiconservativo, no qual ocorre disjunção de uma das fitas do RNAdf 2 pela cadeia que está sendo sintetizada de forma que no final de cada rodada de transcrição, a fita que foi liberada se solta do seu molde e do vírus, e o RNAdf 2 restante contém uma sequência antiga e outra recém-sintetizada (RATTI e BUCK, 1978).

Algumas linhagens em *S. cerevisiae* são incapazes de manter as formas L-B e L-C de RNAdf dentro de suas células, e por isso foram designadas *clo-*. Os autores

que estudaram indivíduos *c/o*- relataram que a baixa concentração dessas moléculas permitiu a visualização de outras formas deste material genético, designadas T e W, encontradas em menor concentração. O fato destas linhagens aumentarem o número de cópias desses RNAdf em torno de 10 vezes quando mantidas a 37° C foi considerado inusitado pelos pesquisadores (WESOLOWSKI e WICKNER, 1984).

2.4.1 Origem e Evolução De Vírus

A origem dos vírus ainda não é conhecida devido à ausência de evidências fósseis e a alta taxa de variação dentro de seus genomas. Análises comparativas têm sido feitas para mostrar similaridades entre vírus e entre proteínas virais e celulares, as quais fornecem subsídios para mostrar como eles possivelmente se originaram e evoluíram (GORBALENYA, 1995).

Há teorias que suportam que as origens da vida no planeta Terra iniciaram com RNA como material genético, e em seguida surgiram as células com genomas de DNA. A natureza dos vírus mais antigos nunca poderá ser determinada, mas já foi sugerida que a forma de vida envolvendo “replicons” de RNA pode ter sido a origem dos vírus de RNA atuais (BECKER, 2000). Tais moléculas primitivas de RNA fornecem um domínio de replicação para os primeiros vírus verdadeiros de RNA, os quais podem ter surgido quando “replicons” ancestrais adquiriram genes para formação de capsídeos (GORBALENYA, 1995).

Vírus de RNA possuem a taxa de mutação mais alta de todos os seres vivos, pois suas RDRPs (RNA Polimerases Dependentes de RNA) não possuem atividade de revisão após a inserção de nucleotídeos durante a replicação de seus genomas. A taxa normal de incorporação errada de novos nucleotídeos é de 10^{-4} , ou 1 erro a cada 10.000 bases. Além da mutação, eventos de recombinação também são considerados como um dos maiores mecanismos agindo na evolução de vírus, pois podem acontecer através de recombinação homóloga entre dois RNAs muito parecidos ou recombinação não-homóloga, entre dois RNAs com algum segmento complementar (ZACCOMER, HAENNI e MACAYA, 1995).

Vírus de fungos, ou micovírus, estão presentes em numerosos fungos e tipicamente contêm genomas de RNA fita-dupla (BUCK, 1986). O fato de muitos micovírus serem latentes ou assintomáticos em seus hospedeiros serve de evidência de que fungos e seus vírus co-evoluíram e se adaptaram num grau considerável (GHABRIAL, 1998). A patogenicidade do vírus e morte da célula hospedeira pode levar a eliminação viral, devido à falta de uma via de infecção extracelular. Análises genéticas comparativas das sequências correspondentes às enzimas RDRP, que são consideradas as mais conservadas entre vírus de RNA, mostram pouca similaridade entre eles (KOONIN, 1992; BRUENN, 2003; KOZLAKIDIS *et al.*, 2006).

Acredita-se que micovírus tenham origens muito antigas. Alguns trabalhos mostram que os grupos de RNAdf originais infectavam células antes da divergência evolutiva entre protozoários e fungos. Essa teoria é suportada pelo fato de que o vírus Hv190SV, encontrado no fungo fitopatogênico *Helminthosporium victoriae*, é mais aparentado com um vírus encontrado em protozoários (Leishmanivirus LRV1 e LRV2) do que com vírus de leveduras, o que sugere que Hv190SV e LRV existiam antes da divergência de protozoários e fungos (GHABRIAL, 1998).

2.4.2 Taxonomia de Micovírus de RNAdf

Há 7 famílias de vírus de RNAdf: Hypoviridae, Totiviridae, Partitiviridae, Chrysoviridae, Reoviridae, Birnaviridae e Cystoviridae, sendo que as 5 primeiras são encontradas em fungos. Essas famílias diferem entre si quanto ao número de segmentos de RNAdf apresentados, sequências de aminoácidos das suas polimerases, tipo e tamanho da partícula viral (MERTENS, 2004). Este organizou estas famílias de acordo com características apresentadas a seguir:

A família Hypoviridae apresenta genoma linear com um fragmento de RNAdf. O material genético encontra-se dentro de vesículas sem capsídeo protéico com diâmetro variável entre 50 a 80 nm. Alguns membros dessa família ocasionam hipovirulência em seus hospedeiros.

A família Totiviridae apresenta dois gêneros, *Totivirus* e *Victorivirus* (GHABRIAL e SUZUKI, 2009). Aparentemente, três formas de expressão da enzima

RDRP são usadas pelos membros dessa família: fundida com a CP (Proteína do Capsídeo), devido a uma mudança na matriz de leitura; fundida com a CP sem a mudança na matriz de leitura; como uma proteína separada. Apresenta um único fragmento de RNAdf, capsídeo icosaédrico com diâmetro variando entre 30 a 40 nm.

A família Chrysoviridae apresenta genoma com quatro segmentos, que são montados separadamente, e capsídeos com diâmetro variando entre 35 a 40 nm. O maior segmento (RNAdf 1) codifica para a RDRP, o RNAdf 2 para a CP, e os outros dois provavelmente estão relacionados com a transcrição, ligação e empacotamento do RNA.

A família Partitiviridae apresenta dois segmentos de RNA e capsídeo de 35 a 40 nm. Há três gêneros descritos para essa família, mas apenas um deles, *Partitivirus*, infecta fungos. Os outros dois gêneros são encontrados infectando plantas.

A família Reoviridae apresenta 10, 11 ou 12 segmentos de RNA, empacotados em capsídeos icosaédricos de 70 a 90 nm.

2.4.3 Genômica e Fisiologia de Vírus de RNAdf

Como processos de polimerização dependentes de RNA codificados nas células hospedeiras são raros, os vírus de RNAdf desenvolveram atividades de polimerase muito específicas para multiplicação do seu genoma, entre elas as das enzimas RDRP e RDDP (“RNA-dependent DNA polymerase”), que são transcriptases reversas. As RDRP dos RNAdf possuem oito motivos conservados que refletem a sua função: reconhecimento do molde de RNA a ser utilizado e/ou atividade de polimerase. A conservação dessas sequências entre as RDRP analisadas sugere a existência de um elemento genético ancestral com atividade de polimerase (POCH *et al.*, 1989; BRUENN, 2003).

Um RNAdf linear isolado de linhagens hipovirulentas de *D. ambigua* representa a forma replicativa de um vírus de RNA. Após a obtenção de uma biblioteca de cDNA da molécula, observou-se que a proteína provável *p125* é traduzida do genoma de 4,1 kb através de uma leitura que passa por três códons de

término, e a extremidade C-terminal dessa proteína contém o domínio RDRP (PREISIG *et al.*, 2000).

Uma caracterização do vírus 1 do fungo *Pleurotus ostreatus* (PoV-1) mostrou a presença de dois fragmentos de RNAdf chamados RNAdf-1 e RNAdf-2 compondo seu genoma. Cada um desses RNAdf contém uma ORF (“Open Reading Frame”) na sua fita positiva enquanto que na fita negativa, não. As sequências dos aminoácidos que foram deduzidas das ORFs codificam para proteínas com muita similaridade às sequências de RDRP e CP de partitivirus. As regiões 5'-UTR (“Untranslated Region”) dos dois segmentos possuem uma parte conservada entre Partitivirus e também uma sequência rica em AC, com função desconhecida. Já a região 3'-UTR contém uma região rica em AU chamada “cauda poli-A interrompida”, que pode ter a função de estabilizar a molécula de RNA durante a replicação (LIM *et al.*, 2004).

No fungo fitopatogênico *Helicobasidium mompa*, encontrado nas raízes de macieiras, foram observados três bandas de RNAdf, chamadas RNAdf 1, RNAdf 2 e RNAdf 3, num gel de poliacrilamida (5%). Utilizando o programa BLAST, foi feita uma análise comparativa dos produtos prováveis expressos pelo RNAdf 1, a qual mostra similiaridade com RDRPs de três outros micovírus da família Partitiviridae (OSAKI *et al.*, 2004).

Em *Sclerotinia sclerotiorum*, fungo fitopatogênico de mais de 400 espécies de plantas, relatou-se a presença de três formas de RNAdf: RNAdf L, RNAdf M e RNAdf S. O RNAdf M, associado com hipovirulência, foi sequenciado e possui 5419 nucleotídeos, excluindo a cauda poli(A). Há uma única ORF do nucleotídeo 93 até o 5195 que codifica uma proteína com grande similaridade às replicases dos vírus de RNAdf. Nesse caso, o RNAdf M contém um domínio conservado referente à metil transferase, helicase e RDRP parecidos com os de Flexiviridae e do vírus F de *Botrytis*. Quando foi feita a transmissão do RNAdf entre linhagens com e sem esse material genético, o isolado receptor apresentou o fenótipo debilitado semelhante ao do doador, Ep-1PN (XIE *et al.*, 2006).

O genoma de um micovírus de *Magnaporthe oryzae* foi sequenciado e revelou possuir 5193 pares de base de tamanho, com duas ORFs: uma codificando para uma CP com grande similaridade para capsídeos de vírus da família Totiviridae e a outra para uma RDRP de 91 kDA de massa molecular, também similar com o encontrado nessa família. Além disso, a proteína possui 8 motivos conservados para as RDRP de micovírus que infectam fungos (MAEJIMA *et al.*, 2008).

Moléculas de RNAdf são ineficazes como modelos de RNA mensageiro para tradução, além de não funcionarem como alvo para transcriptases da célula hospedeira. Esses vírus devem ter então suas próprias enzimas de transcrição e as levar junto à célula hospedeira para que sintetizem seus próprios mRNA para iniciar a síntese das proteínas virais (MERTENS, 2004).

O quadro 1 mostra, de forma resumida, exemplos de fungos fitopatogênicos nos quais RNAdf foram encontrados e classificados taxonomicamente.

ESPÉCIE FÚNGICA	FAMÍLIA VIRAL	REFERÊNCIA
<i>Agaricus bisporus</i>	Chrysoviridae	VAN DER LENDE, 1996
<i>Alternaria alternata</i>	Totiviridae	AOKI <i>et al.</i> , 2009
<i>Aspergillus nidulans</i>	Totiviridae	HAMMOND, 2008
<i>Aspergillus ochraceous</i>	Partitiviridae	LIU <i>et al.</i> , 2008
<i>Botryotinia fuckeliana</i>	Totiviridae	DE GUIDO <i>et al.</i> , 2007
<i>Chalara elegans</i>	Totiviridae	PARK, JAMES e PUNJA, 2004.
<i>Coniothyrium minitans</i>	Totiviridae	CHENG <i>et al.</i> , 2003
<i>Cryphonectria parasitica</i>	Reoviridae	HILLMAN <i>et al.</i> , 2004
<i>Cryphonectria parasitica</i>	Hypoviridae	SHAPIRA e NUSS, 1991
<i>Discula destructiva</i>	Partitiviridae	RONG <i>et al.</i> , 2002
<i>Epichloe festucae</i>	Totiviridae	ROMO <i>et al.</i> , 2007
<i>Fusarium poae</i>	Partitiviridae	COMPEL <i>et al.</i> , 1999
<i>Fusarium solani</i>	Partitiviridae	NOGAWA <i>et al.</i> , 1996
<i>Gremmeniella abietina</i>	Totiviridae	TUOMIVIRTA e HANTULA, 2005
<i>Helicobasidium mompa</i>	Totiviridae	SUZAKI, K, 2005
<i>Helminthosporium victoriae</i>	Totiviridae	HUANG e GHABRIAL, 1996
<i>Helminthosporium victoriae</i>	Chrysoviridae	SOLDEVILA <i>et al.</i> , 2004
<i>Heterobasidium annosum</i>	Partitiviridae	IHRMARK <i>et al.</i> , 2001
<i>Magnaporthe oryzae</i>	Totiviridae	YOKOI, YAMASHITA e HIBI, 2007.
<i>Ophistoma</i> sp.	Totiviridae e Partitiviridae	DOHERTY <i>et al.</i> , 2007
<i>Pleurotus ostreatus</i>	Partitiviridae	QIU, LI e LYU <i>et al.</i> , 2009
<i>Rhizoctania solani</i>	Partitiviridae	STRAUSS, LAKSHMAN e TAVANTZIS, 2000
<i>Rosellinia necatrix</i>	Partitiviridae	SASAKI <i>et al.</i> , 2005
<i>Rosellinia</i> sp.	Reoviridae	WEI <i>et al.</i> , 2004
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	Partitiviridae	LIU, FU e JIANG, 2009
<i>Sphaeropsis sapinae</i>	Totiviridae	PREISIG, WINGFIELD e WINGFIELD, 1998
<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	Totiviridae	REHFELDT e SCHMITT, 2000

QUADRO 1 - FUNGOS FITOPATOGÊNICOS COM RNAdf

Fonte: O autor (2010)

2.4.4 Cura, Transmissão e Influência do RNAdf no Hospedeiro

A presença de RNAdf confere uma redução na virulência (hipovirulência) do fungo *Cryphonectria parasitica* (*Endothia parasitica*). Essas partículas virais são transmitidas de linhagens hipovirulentas para virulentas por fusão de hifas (anastomose). Além de hipovirulência, linhagens do fungo com esses micovírus podem exibir colônias com morfologia alterada, que incluem redução na esporulação e mudanças na pigmentação (ELLISTON, 1985).

O gene *Vir2*, responsável pelo fenótipo virulento de *C. parasitica*, é regulado negativamente na presença de RNAdf. No entanto, não foram observadas evidências de metilação diferencial ou outras alterações genômicas em sequências dentro ou próximas do gene para explicar como o RNAdf realiza essa regulação (ZHANG *et al.*, 1993).

Em *Fusarium graminearum*, a presença de RNAdf está associada com uma coloração vermelho-escura, crescimento reduzido e formato irregular da colônia, além de hipovirulência, no trigo. A transferência deste material genético para um isolado livre dele resultou na apresentação do fenótipo do indivíduo doador. Além disso, quando linhagens isogênicas com e sem RNAdf foram comparadas, as alterações fenotípicas obedeceram à regra geral daquelas infectadas (CHU *et al.*, 2002).

Trabalhos feitos com grupos homocarióticos e heterocarióticos do fungo *Heterobasidium annosum* mostram que houve transmissão horizontal de RNAdf entre o micélio de todos os isolados pareados, exceto no isolado 95163, que não transmitiu o vírus para os outros. A taxa de transmissão vertical de RNAdf, do micélio para os conídios nas duas linhagens em que isto foi avaliado, foi de 3% até 55%, de um total de 104 e 176 esporos, respectivamente (IHRMARK *et al.*, 2002).

Um isolado do fungo *E. parasitica* foi curado de RNAdf ao se utilizar ciclohexamida no meio de cultura. Outros dois indivíduos estudados não foram curados possivelmente devido a fatores nucleares que garantem a estabilidade dessas moléculas. No entanto, a linhagem curada apresentou um grande aumento na virulência, o que indica um fenótipo hipovirulento associado ao RNAdf (FULBRIGHT, 1984).

Resultados interessantes foram obtidos com o entomopatógeno *Beauveria bassiana*. Em bioensaio contra o percevejo marrom da soja, *Euschistus heros*, um isolado de *B. bassiana* com RNAdf foi menos virulento que o isogênico, o que evidencia o caráter de hipovirulência do RNAdf neste fungo (DALZOTO *et al.*, 2006).

Em estudos com o fungo endofítico *Epichlœ festucae*, um vírus de RNAdf foi identificado como pertencente à família Totiviridae. As tentativas feitas para curar linhagens portadoras dessas partículas virais através de calor falharam, e o que se observou é que em temperaturas elevadas, a concentração do vírus aumenta nesta espécie. Segundo os autores, este fato sugere a destruição de mecanismos mantenedores da homeostase nas células (ROMO *et al.*, 2006).

O fenômeno de micocinogenia (“fenótipo killer”) também foi relatado para o isolado VKM Y-2897 da espécie *Cystofilobasidium infirmominiatum*, quando ele foi cultivado em condições de pH 3,5 a 5,5, a 18 °C e a 5 °C, e pareado com VKM Y-1265. Nestes casos, foi observado o surgimento de uma zona de inibição em placa (halo azulado) composta por células mortas, evidenciado com a adição de azul de metileno. RNAdf foi encontrado nesse isolado, e após experimentos de cura em que essas moléculas foram eliminadas, o fenótipo micocinogênico desapareceu (GOLUBEV *et al.*, 2003).

Um isolado selvagem de *Aspergillus niger*, com RNAdf, formou setores sem conídios e com taxa de crescimento reduzida. Observou-se que esse fenótipo anormal possui uma concentração de micovírus elevada quando comparada com o micélio adjacente da colônia, devido a intensidade das bandas de RNAdf. A isolado Ind1.8.16 foi o único que foi curado através de isolamento sequencial de ponta de hifa de um total de 10 indivíduos (DIAPENINGEN, DEBETS e HOEKSTRA, 2006).

Os micovírus em *Fusarium poae* foram classificados como crípticos, pois não foram observadas alterações morfológicas nas colônias devido à infecção. Alguns desses elementos de RNAdf estavam encapsulados enquanto que outros não possuíam capsídeo protéico, e ambos os tipos estavam presentes no mesmo isolado. As sequências de aminoácidos obtidas para os clones de cDNA do isolado FUP0-1 sugerem que os dois fragmentos observados em gel de agarose codificam um para uma RDRP e outro para o capsídeo. Essa organização genômica é típica de vírus da família Partitiviridae (COMPEL *et al.*, 1999).

2.4.5 Silenciamento Gênico e Vias de RNA-interferência

A produção de RNAdf em células eucarióticas, geralmente como resultado de replicação viral ou transcrição de elementos transponíveis e sequências de DNA repetitivo, constitui diferentes tipos de respostas de defesa celular. Num deles, o RNAdf é reconhecido e clivado pela RNase III (Dicer) para produzir dúpliques de siRNAs (“short-interfering RNA”) de 20 a 25 nucleotídeos (MEISTER; TUSCHL, 2004).

A introdução de transgenes ou RNAdf em células eucarióticas pode disparar uma série de mecanismos PTGS (“Post-Transcription Gene Silencing”) nos quais o RNAdf, depois de ser processado em siRNAs, foi identificado como forte indutor de degradação de mRNA (CATALANOTTO, NOLAN e COGONI, 2005).

A produção de siRNA inicia a via de RNA-interferência (RNAi), também chamada de silenciamento gênico pós-transcricional. Os siRNAs são dirigidos ao RISC (“RNA Induced Silencing Complex”) com uma proteína da família Argonauta (Ago) no cerne, e guiam este complexo no reconhecimento e clivagem de mRNA homólogos ou no silenciamento transcricional do locus de DNA homólogo. Proteínas Dicer e Argonauta são centrais no processo de RNAi (HAMMOND, 2005).

Os primeiros estudos em relação às vias de interferência de genes, em fungos, foram realizados com *Neurospora crassa* (COGONI e MACINO, 1997). Os autores, sabendo que a introdução de transgenes em fungos pode levar à inativação gênica, introduziram o gene *al-1*, naturalmente encontrado no fungo e responsável pelo fenótipo alaranjado, em um isolado específica de *N. crassa*. Isso estabeleceu um sistema genético no qual a cor pôde ser usada para identificar linhagens silenciadas (albinas) e com silenciamento defectivo (alaranjadas). Num isolado silenciado, foi observado uma redução no nível de mRNA de *al-1* endógeno, nível normal do RNA precursor de *al-1* e a presença de transcritos *al-1* transgênicos. Por outro lado, num isolado *qde* (“Quelling Deficient”, ou seja, deficiente no silenciamento), havia um nível aumentado de mRNA *al-1* endógeno. Esse experimento constituiu o primeiro passo na identificação de fatores necessários para o silenciamento gênico.

Foi demonstrado pela primeira vez em eucariotos não-vertebrados que a introdução de RNAdf na forma de plasmídeos leva a indução da expressão dos

genes *qde-2*, *dcl2* (para a enzima Dicer 2) e outros envolvidos na via de RNAi em *N. crassa*. O RNAdf regula QDE-2 (proteína Argonauta) tanto transcricional quanto pós-transcricionalmente, e esse último modo é dependente de enzimas Dicer (CHOUDHARY *et al.*, 2007).

Foram estudados três micovírus de *Aspergillus*: vírus 1816, vírus 178 e vírus 341 e suas associações com micovírus de outros fungos foram caracterizadas por comparação com as RDRP expressadas. O vírus 1816 bloqueia a via de silenciamento de RNA através de um mecanismo que altera o nível de siRNAs. O vírus 178 parece não afetar o silenciamento, enquanto foi observada a presença de siRNA derivados do vírus 341, o que demonstra que ele é um alvo para a maquinaria de RNAi de *Aspergillus* (HAMMOND *et al.*, 2008).

Estudos de silenciamento gênico também foram feitos na espécie *C. parasitica*. Foram obtidas colônias com mutantes que anulavam os genes *dcl-1*, *dcl-2* e ambos (*dcl-1/dcl-2*), por recombinação homóloga. Todas elas apresentavam fenótipos indistinguíveis da colônia selvagem. Para testar se as proteínas Dicer dessa espécie estavam envolvidas numa resposta antiviral, as colônias foram infectadas por transfecção de esferoplastos contendo transcritos virais e anastomose. As colônias com *dcl-2* e *dcl-1/dcl-2* mutantes apresentaram algumas mudanças fenotípicas, como alteração na pigmentação do micélio e taxa de crescimento reduzida. Após complementação da colônia mutante para *dcl-2* com o gene selvagem *dcl-2*, o fenótipo foi revertido para o selvagem. Os autores identificaram, então, o gene *dcl-2* como um componente primário para uma via antiviral (SEGERS *et al.*, 2007).

Após hibridação por “Northern blotting” com uma sonda correspondente a uma sequência específica do vírus CHVI-EP713 de *C. parasitica* de um isolado infectado por RNAdf, evidenciou-se uma banda em gel com mais ou menos 21 nucleotídeos, que mostra a presença de vsRNA (RNA vírus-específico) na amostra. vsRNA ocorre após a clivagem, por Dicer, de RNAdf. Não houve formação de uma banda correspondente quando a hibridação foi realizada num isolado livre de RNAdf. Clonagem e sequenciamento desses vsRNA mostraram que 73% dos clones obtidos eram homólogos à sequência de RNA do micovírus (ZHANG *et al.*, 2008).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MATERIAL BIOLÓGICO

Os isolados utilizados no trabalho foram coletados de *Citrus* sp., conforme apresentado no Quadro 2, e armazenados na micoteca do Laboratório de Genética de Microrganismos, UFPR.

CADASTRO LABGEM	ISOLADOS	RNA ^{df} E HALO	ANO	ISOLAMENTO
LGMF13	ECLAP	+	2008	Paranavaí - PR
LGMF434	PC3C	+	-	África do Sul
-	PCIAC19/02	+	2002	Cordeirópolis – SP
-	PC7LD6	+	1996	Mogi-Guaçu - SP
LGMF4	PC28/05	+	2005	Jaboticabal – SP
LGMF6	PC33/05	+	2005	Jaboticabal - SP
-	PC7LE10	+	2002	Mogi-Guaçu - SP
LGMF49	FTMi3.1	-	2009	Doutor Ulysses - PR
LGMF86	FTMO9.2	-	2009	Doutor Ulysses - PR
LGMF187	FTP25.6	-	2009	Cerro Azul - PR
LGMF195	FTP27.3	-	2009	Cerro Azul - PR
LGMF201	FTP31	-	2009	Cerro Azul - PR
LGMF206	FTP33.4	-	2009	Cerro Azul - PR
LGMF48	FTMi2.5	-	2009	Cerro Azul - PR
LGMF111	FTP3.12	-	2009	Cerro Azul - PR
LGMF126	FTP4.11	-	2009	Cerro Azul – PR
LGMF137	FTP6.15	-	2009	Cerro Azul – PR
LGMF140	FTP7.1	-	2009	Cerro Azul – PR
LGMF148	FTP11.3	-	2009	Cerro Azul – PR

QUADRO 2 – PRESENÇA DE RNA^{df}, HALO, ANO E PROCEDÊNCIA DOS ISOLADOS DE *G. citricarpa* UTILIZADOS NO TRABALHO

Também foi utilizado um isolado de *G. mangiferae*, EC13C, para se avaliar a compatibilidade genética entre indivíduos de diferentes espécies.

3.2 MEIOS DE CULTURA

3.2.1 Meio Completo (MC) (PONTECORVO et al., 1953, modificado por AZEVEDO; COSTA, 1973)

NaNO ₃	6,0 g
KH ₂ PO ₄	1,5 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,5 g
KCl	0,5 g
FeSO ₄	0,01 g
ZnSO ₄	0,01 g
Glicose	10,0 g
Extrato de levedura	2,0 g
Peptona	2,0 g
Caseína hidrolizada	1,5 g
Solução de vitaminas	1,0 mL
Água destilada	p/ 1.000 mL

O pH foi ajustado para 5,8 com NaOH 1 mol/L. Para MC sólido, foi acrescentado 1,5% de ágar. O meio foi autoclavado e armazenado em temperatura ambiente.

3.2.2 Meio Citros (STRINGARI, 2009)

Solução de folhas de Citros	28 g
Glicose	20 g
Água destilada	p/ 1000 mL

O pH foi ajustado para 5,8 com NaOH 1 mol/L. Para meio citros sólido, foi acrescentado 1,5% de ágar. O meio foi autoclavado e armazenado em temperatura ambiente.

3.2.3 Meio Aveia (BAAYEN *et al.*, 2002)

Aveia em flocos	20 g
Água destilada	p/ 1000 mL
Ágar	15 g

A aveia foi adicionada em 800 mL de água destilada e aquecida por 20 minutos em forno microondas. A solução foi filtrada em gaze e o volume completado para 1000 mL. O pH foi ajustado para 5,8 com NaOH 1N e o ágar acrescentado diretamente aos frascos. O meio foi autoclavado e armazenado em temperatura ambiente.

3.3 SOLUÇÕES E TAMPÕES

3.3.1 Tampão de Extração de DNA (RAEDER; BRODA, 1985)

Tris-HCl pH 8,0	200 mM
NaCl	250 mM
EDTA	25 mM
SDS (p/v)	1%

A solução foi preparada e aquecida a 60°C no momento do uso.

3.3.2 Solução Tris-HCl 1 M pH 8,0 (estoque)

O pH desta solução foi ajustado para 8,0 com HCl 5 mol/L. A solução foi autoclavada e mantida a 4°C. Ocasionalmente o pH foi ajustado para outros valores.

3.3.3 Solução Salina

NaCl 0,85% (p/v) em H₂O destilada. A solução foi autoclavada e mantida a 4°C.

3.3.4 Solução EDTA 0,5 M pH 8,0 (estoque)

O pH desta solução foi ajustado para 8,0 com pastilhas de NaOH 10 mol/L. A solução foi autoclavada e mantida a 4°C.

3.3.5 SDS 20% (p/v)

Dodecil Sulfato de Sódio	20 g
H ₂ O Milli-Q	100 mL

A solução foi autoclavada e mantida em temperatura ambiente.

3.3.6 Fenol (SAMBROOKS, FRITSCH, MANIATIS, 1989)

A solução estoque de fenol foi derretida em banho-maria a 60°C até obtenção de uma fase líquida. Um volume foi transferido para um Becker e a ele foi adicionado 0,1% de 8-hidroxiquinolina, que torna a solução amarela e evita a oxidação da mesma. Em seguida foram realizados banhos com Tris-HCl pH 8,0 em que o volume utilizado deve ser o mesmo do Fenol. O primeiro banho foi realizado com Tris-HCl 0,5 M e os outros com Tris-HCl 0,2 M. Ao final de cada lavagem deve se medir o pH do fenol com uma fita indicadora. Quando ele estava superior a 7,6, foi considerado equilibrado, e conservado a uma temperatura de 4°C até o momento do uso.

3.3.7 Acetato de Sódio pH 4,7

O pH foi ajustado para 4,7 com ácido acético glacial (CH_3COOH) 5 mol/L.

3.3.8 Clorofane

Fenol equilibrado e clorofórmio P.A. na proporção de 1:1.

3.3.9 Clorofil

Clorofórmio	24 volumes
Álcool Isoamílico	1 volume

3.3.10 Tampão EBA

Tris-HCl pH 8,0	50 mM
EDTA	50 mM
SDS	3%
2-Mercaptoetanol	1%

3.3.11 Tampão STE

Tris-HCl pH 8,0	10 mM
NaCl pH 8,0,	100 mM
EDTA pH 8,0	1 mM

3.3.12 Tampão de amostra (“gel loading buffer”)

Sacarose	38%
Azul de bromofenol	1%
EDTA	67 mM

3.3.13 Tampão TBE 5x (solução estoque)

Tris-base	54 g
Ácido Bórico	27,5 g
EDTA 0,5 M pH 8,0	20 mL
H ₂ O destilada	p/ 1000 mL

A solução foi autoclavada e mantida em temperatura ambiente. No momento do uso, foi diluída convenientemente em água destilada.

3.3.14 Solução de Brometo de Etídio

O brometo de etídio foi dissolvido (1,0% p/v) em água destilada. No momento do uso, foram adicionados 3 µl em 100 mL de água destilada. A solução foi mantida em temperatura ambiente.

3.3.15 Solução de Gelred™ (BioAmerica)

Adicionou-se 1 µL de GelRed™ 10.000 x concentrado em DMSO a 1000 µL de tampão de amostra. Aplicou-se 30 % do volume total da amostra diretamente a ela.

3.3.16 DNase (Invitrogen)

A enzima foi fornecida na concentração de 160 U/µL. Foi preparada na concentração de 1 U/µL em tampão de reação (Tris-HCl 200 mM pH 8.4, MgCl₂ 20 mM, KCl 500 mM) e estocada a -20° C e utilizada conforme indicações do fabricante.

3.3.17 Nuclease S1 (Invitrogen)

A enzima foi fornecida na concentração de 1000 U/µL. Foi preparada na concentração de 10 U/µL em Nuclease Dilution Buffer, já fornecido. Estocada a -20° C e utilizada conforme indicações do fabricante.

3.3.18 Solução de Ciclohexamida (20 mg/mL)

Ciclohexamida	0,61g
Acetona	0,5mL
H ₂ O MilliQ	30mL

A solução foi esterilizada por filtração. No momento do uso, foi diluída convenientemente.

3.3.19 Solução de Tween 80

Tween 80 0,1% (v/v) em H₂O destilada. A solução foi autoclavada e mantida a 4°C.

3.3.20 Solução de Vitaminas

Ácido Nicotínico	100,0 mg
Ácido <i>p</i> -Aminobenzóico	10,0 mg
Biotina	0,2 mg
Piridoxina	50,0 mg
Riboflavina	100,0 mg
Tiamina	50,0 mg
H ₂ O destilada esterilizada	p/ 100 mL

A solução foi aquecida em banho-maria a 98°C por 15 minutos e armazenada em frasco escuro, previamente autoclavado, a 4°C.

3.4 PREPARO DO MATERIAL

3.4.1 Esterilização

Meios de cultura, soluções, espátulas, graís de porcelana, pistilos e alça de transferência foram esterilizados em autoclave, à pressão de 1 atmosfera, por 20 minutos.

Vidrarias foram esterilizadas em forno Pasteur a 180° C por 4 horas.

3.4.2 Extração de ácidos nucléicos totais

Para a extração de ácidos nucléicos totais das linhagens estudadas foi utilizado o protocolo de RAEDER e BRODA (1985) modificado por GLIENKE (1995).

Foram feitos pontos de repique de cada isolado em 3 placas contendo Meio Completo (item 3.2.1) coberto por um disco de celofane. Este material foi incubado em estufa por um período de 5 a 6 dias, dependendo do crescimento das colônias.

Após este período, os micélios foram raspados das placas utilizando espátulas esterilizadas, vedados com filme de parafina em recipientes de vidro e mantidos em freezer, a uma temperatura inferior a 4°C até serem liofilizados.

Posteriormente a esta etapa, foram testados 5 tipos diferentes de extração de ácidos nucléicos.

3.4.2.1 Extração de ácidos nucléicos totais com fenol pH 8,0

O início da extração de ácidos nucléicos totais se dá pela adição de nitrogênio líquido aos micélios, que foram triturados em gral com um pistilo até se formar um pó fino. Este pó foi transferido para 4 tubos eppendorf (40 – 60 mg/tubo) e 1 mL de tampão de extração (item 3.3.1) foi adicionado, aquecido a 60°C.

Os tubos foram homogeneizados em Vortex até a obtenção de uma solução homogênea, e mantidos em banho-maria a 70°C, sem submersão, por 30 minutos. Esses tubos foram centrifugados por 10 minutos a 7618 g. O líquido sobrenadante foi coletado e transferido para outros tubos.

Adiciona-se um volume de fenol equilibrado pH 8,0 (item 3.3.6) a cada um dos tubos, que foram centrifugados por 15 minutos a 7618 g. Em seguida, a fase sobrenadante foi coletada e transferida para outros tubos, aos quais se adicionou clorofane (item 3.3.8). Foram centrifugados nas mesmas condições. Repetiu-se o procedimento com adição de clorofil (item 3.3.9) e centrifugação por 15 minutos a 7618 g. A fase sobrenadante foi transferida para tubos novos e um volume de 60% de isopropanol foi adicionado a ela.

Estes tubos foram mantidos a -20 °C por no mínimo 1 hora, para haver precipitação dos ácidos nucleicos. Os tubos foram centrifugados novamente por 20 minutos a 11802 *g* e o sobrenadante foi descartado. O precipitado foi lavado com etanol 70% (200 µL por tubo) e centrifugado por 5 minutos a 11802 *g*.

O etanol foi descartado e os tubos foram deixados abertos a 50°C por 1 hora em estufa de secagem, ou durante a noite em temperatura ambiente. Os ácidos nucleicos foram ressuspensos em água Milli-Q esterilizada.

3.4.2.2 Extração de ácidos nucleicos totais com fenol pH 4,7

Visando a otimização da extração de RNA foi proposta uma modificação no protocolo de RAEDER e BRODA (1985) modificado por GLIENKE (1995). Em pH maior que 7,0, DNA e RNA separam-se em fase aquosa. Em pH menor que 7,0, o DNA é desnaturado, precipitando para a fase orgânica, de forma que na fase aquosa (sobrenadante), encontre-se apenas RNA (SAMBROOK *et al.*, 1989). O fenol (item 3.3.6) foi equilibrado com tampão ácido (obtido com ácido acético glacial P.A.) acetato de sódio pH 4,7, aplicando-se 65 µL deste tampão a cada 1 ml da solução de fenol. (BIOAGENCY BIOTECNOLOGIA, 2009).

3.4.2.3 Extração de ácidos nucleicos totais com 2-mercaptoetanol (BALLIJA, KVARNHEDEN e TURCHETTI, 2008)

Num tubo eppendorf, 40 – 60 mg desse pó foram ressuspensos em 600 µL do tampão EBA (item 3.3.10). A suspensão foi centrifugada a 4° C por 15 minutos a 11500 rpm e o sobrenadante foi coletado e ajustado a uma concentração final de 20% etanol. Adicionou-se o tampão STE-20% E (item 3.3.11) e centrifugou-se o tubo por 15 minutos a 11500 rpm. O “pellet” obtido foi lavado com etanol e o tubo foi colocado para secar.

3.4.2.4 Viral Nucleic Acid Extraction Kit (RBC BIOSCIENCE)

O kit foi utilizado conforme instruções do fabricante.

3.4.2.5 AxyPrep Multisource Total RNA Miniprep Kit (AXYGEN BIOSCIENCES)

O kit foi utilizado conforme instruções do fabricante.

3.4.3 Eletroforese

A eletroforese foi conduzida em gel de agarose 1% banhado por tampão TBE 1x (item 3.3.13) a 3 V/cm, para quantificação, ou em agarose 1,5%, após PCR. O padrão de peso molecular foi o DNA do fago λ clivado com a enzima *HindIII*, ou Ladder de DNA 100 pb (Invitrogen). A observação das bandas foi feita em transiluminador de luz ultravioleta após imersão em solução de brometo de etídio (item 3.3.14), ou com o corante GelredTM (Uniscience) (item 3.3.15) aplicado diretamente no gel.

3.4.4 Cura do RNAdf

Dois procedimentos para a obtenção de linhagens livres de RNAdf foram utilizados. O primeiro envolve o uso de ciclohexamida (item 3.3.18), um inibidor da síntese protéica que impede a liberação do tRNA desacilado do sítio peptidil (P) do ribossomo (BOTTGER, BLANAR e FLAVELL, 1988). Após a fusão do meio, quando este apresenta uma temperatura entre 45 e 50°C, adicionou-se ciclohexamida em concentrações variadas (100, 50, 15, 10, 5, 1 e 0,5 µg/mL). Logo depois o meio foi homogeneizado para ser vertido em placas de Petri.

O outro procedimento foi através da incubação das colônias em temperatura moderadamente alta (35°C) por duas gerações. De início, para cada isolado foi realizado um repique em Meio Completo. As placas de Petri ficaram em estufa a 35°C por 20 dias e, a partir das colônias que se desenvolveram, foi realizado mais um repique para obter a 2ª geração nessa temperatura. Após 20 dias foi realizado o 3º repique, porém, neste, as placas ficaram em estufa a 28°C.

Todos os repiques foram feitos com auxílio de lupa para a secção das pontas das hifas crescidas nos meios de cultura (repiques de pontas de hifas).

3.4.5 Caracterização dos isolados com e sem vírus

Para se diferenciar linhagens dentro da espécie *G. citricarpa* foram realizados dois procedimentos. O primeiro incluiu o uso da técnica de RAPD para a tentativa de obtenção de um marcador molecular capaz de identificar isolados portadores de RNA_{df} de outros sem infecção.

Para o RAPD, uma alíquota de 1 µL do DNA extraído foi diluído na proporção de 1:100 µL ou diluição apropriada para a concentração final de 50 ng/µL de DNA em H₂O Milli-Q. As reações de RAPD foram preparadas em tubos novos esterilizados de 0,2 mL. Para cada “primer” utilizado foi feito um “mix” contendo 3 mM de MgCl₂, tampão PCR 1x, 0,2 mM de cada dNTP, 1,5 U de *Taq* polimerase (0,3 µL) em um volume final de 25 µL.

A amplificação foi realizada em um termociclador Eppendorf (Modelo: Mastercycler gradient) de acordo com as seguintes etapas: desnaturação inicial a 95°C por 4 minutos, 40 ciclos de 1 minuto a 92°C, 1,5 minuto a 37°C, 2 minutos a 72°C e extensão final de 3 minutos a 72°C. Os “primers” utilizados foram da Operon Technologies, conforme indica o Quadro 3.

PRIMER	SEQUÊNCIA
OPX 11	5' GGAGCCTCAG 3'
OPX 14	5' ACAGGTGCTG 3'
OPX 17	5' GACACGGACC 3'
OPX 19	5' TGGCAAGGCA 3'

QUADRO 3 - SEQUÊNCIAS DOS “PRIMERS” UTILIZADOS NO RAPD

FONTE: Operon Technologies®

A identificação morfológica das linhagens de *G. citricarpa* foi realizada de acordo com BAAYEN *et al.*, 2002.

As colônias foram inoculadas em meio Aveia (item 3.2.3) e incubadas por 7 a 10 dias, à 22°C na ausência de luz. As linhagens foram analisadas quanto à presença ou ausência de um halo amarelo ao redor da colônia. STRINGARI, 2009, relatou algumas linhagens desta espécie que não formam halo neste meio (Quadro 2).

3.4.6 Transmissão horizontal de RNAdf

Duas linhagens foram inoculadas no centro de uma placa de Petri com Meio Citrus (item 3.3.2) a uma distância de um centímetro entre os inóculos. A morfologia das colônias foi observada após o crescimento por 14 dias a 28°C.

As linhagens de *G. citricarpa* que apresentaram compatibilidade foram utilizadas para a transferência horizontal de RNAdf. O isolado PC 33/05, portador do vírus de RNAdf, foi inoculado com outros livres do vírus e não formadores de halo, em Meio Citrus (item 3.3.2). Foram realizadas 3 repetições desses repiques, totalizando 36 placas. Depois de 25 dias de crescimento a 28°C, foi feita uma coleta dos esporos da região de encontro entre os isolados. Foi feita uma suspensão de esporos num tubo Falcon com 2 mL de solução Tween (item 3.3.19). Com o auxílio de um bastão de vidro esse material foi macerado contra as paredes do Falcon até a solução ficar levemente turva, e na sequência foi plaqueada com auxílio de uma alça de Drigalski em placas contendo Meio Citrus (item 3.3.2). As colônias monospóricas

obtidas foram repicadas em Meio Aveia (item 3.3.3). Aquelas que se desenvolveram sem o surgimento do halo foram investigadas quanto a presença de RNAdf.

3.4.7 Comparação da morfologia e crescimento radial de linhagens isogênicas

Linhagens submetidas aos protocolos de cura e de transmissão de RNAdf foram avaliadas quanto a presença ou ausência da banda de RNAdf em gel de agarose. Em seguida, as linhagens sem banda de RNAdf, submetidas ao protocolo de cura e as com banda, após o protocolo de transmissão foram analisadas quanto ao crescimento radial das colônias. As linhagens selvagens submetidas ao experimento de cura foram comparadas com seus respectivos setores formados. As linhagens sem RNAdf submetidas a anastomose de hifas foram comparadas com as colônias que possivelmente receberam o vírus após contato de hifas.

As linhagens foram repicadas em Meio Completo (item 3.3.1) com um furador de rolha de 8 mm e incubadas em estufa a 28 °C. Após 15 dias de crescimento, o tamanho da colônia foi mensurado. Cinco repetições foram feitas para cada isolado.

Testes estatísticos para a comparação de linhagens portadoras e não-portadoras dos vírus de RNAdf foram feitos com o programa ASSISTAT 7.5 beta (SILVA, 2010). Para estes testes, foi utilizado o delineamento estatístico inteiramente casualizado (DIC) e a partir dos dados obtidos, foi realizada a análise de variância (ANOVA) e o teste de Tukey para médias.

3.4.8 Produção de cDNA

Foi utilizado o protocolo descrito por PARK *et al.* (2004) para produção de cDNA de RNAdf de *Chalara elegans*, com algumas modificações.

Uma amostra de 2,5 µL de RNAdf foi misturada com 2 µL de Random Primers (3 µg/µL) (Invitrogen), fervida por 10 minutos para desnaturação da fita dupla e imersa imediatamente em gelo. O cDNA da primeira fita foi sintetizado usando 3,5 µL da amostra previamente obtida junto de 1 µL de DTT 100 mM (Invitrogen), 2 µL

de “First Strand Buffer” 5x (Invitrogen), 0,5 µL de cada dNTP (10 mM), 0,5 µL de “Superscript L1 Reverse Transcriptase” 50 U (Invitrogen) e 2 µL de água Milli-Q. A mistura foi incubada a 42 °C por 45 minutos e desnaturada a 99 °C por 5 minutos. O cDNA da segunda fita foi sintetizado em reações de PCR contendo 14 µL do produto da primeira fita, 1 µL de cada dNTP (10 mM), 1,5 µL de MgCl₂ (50 mM), 1 µL de “Random Primers” (3 µg/µL), 0,5 µL de Taq polimerase (5 U/µL), 2,5 µL de tampão de Taq polimerase e 30,5 µL de água Milli-Q. As condições de amplificação foram: 1 ciclo a 94 °C por 5 minutos, 35 ciclos a 94 °C por 1 minuto, 55 °C por 45 segundos, 72 °C por 2 minutos e um ciclo a 72 °C por 10 minutos, para a extensão final. Os produtos amplificados após RT-PCR foram submetidos à eletroforese, 3 V/cm por 2 horas em gel 1% e visualizados com auxílio de luz ultravioleta.

3.4.9 Filogenia

Com base nas sequências de regiões codificadoras dos genomas de vírus da família Totiviridae obtidas no NCBI, foi formado um alinhamento de nucleotídeos através do BioEdit versão 7.0.5.3 (HALL, 1999), programa Clustal W (LARKING *et al.*, 2007). A tradução para a sequência de aminoácidos foi feita pelo programa MEGA versão 4 (TAMURA *et al.*, 2007). Em seguida, foram submetidas ao programa PAUP 4.0b10 (SWOFFORD, 2002), no qual foi feita uma análise de parcimônia com bootstrap = 1000, com o fitovírus “Black raspberry Virus F” como “outgroup”. As árvores obtidas foram desenhadas com o programa Mesquite 2.72 (MADDISON e MADDISON, 2009). Também foram analisadas as regiões ITS1-5,8S-ITS2 das espécies fúngicas hospedeiras destes micovírus, seguindo a mesma metodologia.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 COMPARAÇÃO DOS DIFERENTES PROTOCOLOS DE EXTRAÇÃO DE ÁCIDOS NUCLEÍCOS TOTAIS

Um isolado positivo para teste de patogenicidade de *G. citricarpa*, PC33/05, previamente descrito por SILVA *et al.*, (2008) como portador de vírus de RNAdf, foi selecionado como modelo para o estudo.

A Figura 1 mostra resultados obtidos após tratamentos com fenol e 2-mercaptoetanol.

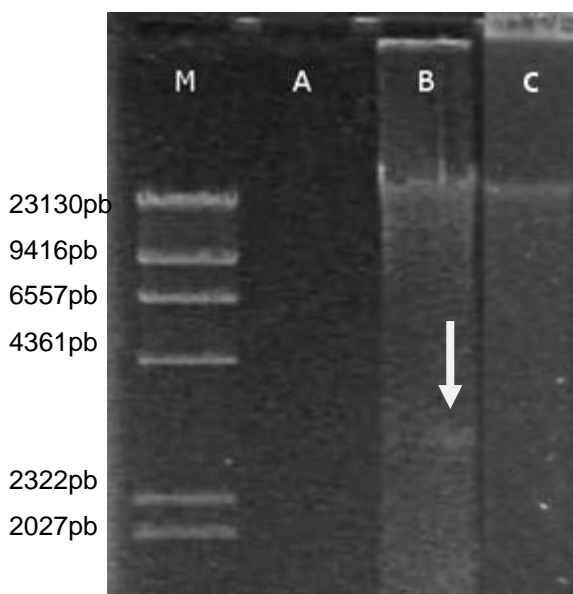


FIGURA 1 – ÁCIDOS NUCLEÍCOS TOTAIS DO ISOLADO PC33/05 OBTIDOS COM FENOL E 2-MERCAPTOETANOL

NOTA: M: DNA do fago λ clivado com *Hind* III. A: PC33/05 após extração com 2-mercaptoetanol. B: PC33/05 após extração com fenol pH 8,0. C: extração com 2-mercaptoetanol, protocolo modificado. Seta indica banda de RNAdf.

FONTE: O autor (2010)

O protocolo de extração com 2-mercaptoetanol apresenta melhorias quanto ao que utiliza fenol, devido à velocidade da obtenção de resultados além da pureza das amostras obtidas (BALIJJA; KVARNHEDEN; TURCHETTI, 2008). Como não foram utilizadas micro-colunas tratadas com celulose CF-11, a qual possui afinidade com RNA dupla-fita, como o autor sugere, nenhum material genético pode ser visualizado utilizando essa metodologia (FIGURA 1, A). No entanto, o uso de etanol

a 4 °C permitiu que o material genético extraído precipitasse (Figura 1, C). O DNA genômico nesta canaleta pode ser observado e apresentou 10,8 ng, após quantificação em espectrofotômetro, mas ainda assim a banda de RNAdf, não. Dados da literatura mostram que a concentração de RNAdf obtida após purificação de ácidos nucleicos totais é pequena quando comparada com o DNA genômico total da amostra. Por isso, existe a possibilidade da concentração de RNAdf não ter sido suficiente para ser visualizada em eletroforese.

Também foram testados um protocolo de extração com fenol ácido e dois *kits* comerciais para extração de RNA: Viral Nucleic Acid Extraction Kit (RBC Bioscience) e AxyPrep Multisource Total RNA Miniprep Kit (Axygen Biosciences), conforme instruções dos fabricantes.

Separações de ácidos nucleicos por fenol são pH dependentes, por isso pode-se utilizar tampões para auxiliar na separação do ácido nucleico desejado. O uso de fenol equilibrado com acetato de sódio pH 4,7 produziu resultados melhores que fenol pH 8,0 e que os “kits” testados (Quadro 4).

Foram utilizados 30 mg de micélio triturado em nitrogênio líquido para cada um dos testes, e após eletroforese, observou-se o seguinte padrão de bandas (Figura 2). A e B.

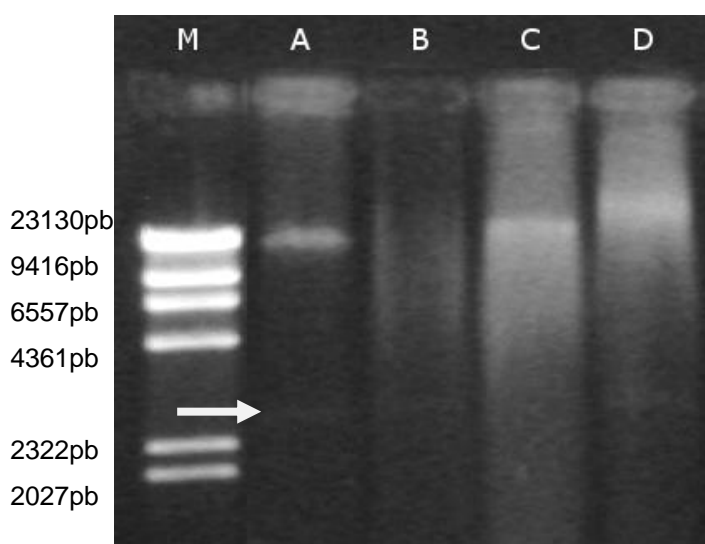


FIGURA 2 – ÁCIDOS NUCLEÍCOS TOTAIS DO ISOLADO PC33/05

NOTA: M: DNA do fago λ clivado com *Hind* III. A: PC33/05 após extração com fenol pH 8,0. B: PC33/05 após extração com fenol ácido pH 4,7. C: PC33/05 após extração com Viral Nucleic Acid Extraction Kit (RBC Bioscience). D: PC33/05 após extração com AxyPrep Multisource Total RNA Miniprep Kit (Axygen Biosciences). Seta indica banda de RNAdf.

FONTE: O autor (2010)

Fenol pH 8,0		Fenol pH 4,7		Kit RBC		Kit Axygen	
DNA	RNA _{df}	DNA	RNA _{df}	DNA	RNA _{df}	DNA	RNA _{df}
54,88 ng	5,62 ng	-	9,4 ng	65,63 ng	-	62,80 ng	7,2 ng

QUADRO 4 – QUANTIFICAÇÃO DE DNA GENÔMICO E RNA DUPLA-FITA
 FONTE: O Autor (2010).

Na quantificação dos ácidos nucleicos totais, observou-se a degradação da banda de DNA genômico pelo fenol ácido e aumento da purificação do RNA_{df}. O resultado obtido com “Viral Nucleic Acid Extraction Kit” (FIGURA 2, C) apresenta grande arraste de material na canaleta, o que revela um baixo potencial de purificação para RNA_{df} de fungos filamentosos, como a *G. citricarpa*. O resultado obtido com “Axyprep Multisource Total RNA Miniprep Kit” (FIGURA 2, D), embora melhor que a anterior em relação à banda de RNA_{df}, ainda assim apresenta arraste de material no gel. Para obtenção de uma amostra contendo apenas RNA_{df}, pronta para ser submetida a RT-PCR (*Reverse Transcriptase PCR*), foram realizados tratamentos enzimáticos utilizando DNase e Nuclease S1 (FIGURA 3).

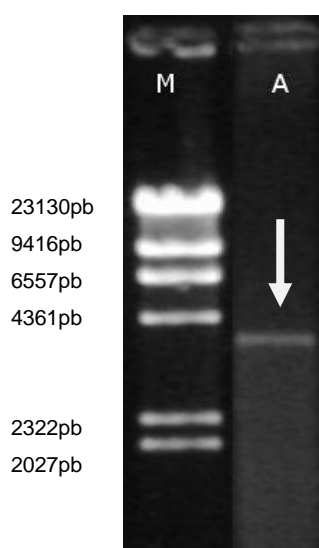


FIGURA 3 – ÁCIDOS NUCLEÍCOS TOTAIS DO ISOLADO PC33/05 TRATADOS COM DNASE E NUCLEASE S1

NOTA: M: DNA do fago λ clivado com *Hind* III. A: PC33/05 após tratamento com DNase e Nuclease S1. Seta indica banda de RNA_{df}.

FONTE: O Autor (2010)

Utilizando o programa Kodak D-1, foi feita uma estimativa do tamanho do fragmento de RNAdf em nucleotídeos, além de uma quantificação mais precisa deste material (Quadro 5).

λ Hind III	λ Hind III	RNAdf	RNAdf
PESO MOLECULAR (pb)	MASSA (ng)	PESO MOLECULAR (pb)	MASSA (ng)
23130	476,9	3795	36,19
9416	194,1		
6557	135,2		
4361	89,9		
2322	47,9		
2027	41,8		

QUADRO 5 – QUANTIFICAÇÃO E ESTIMATIVA DO TAMANHO DA BANDA DE RNA DUPLA-FITA DE PC33/05
FONTE: O Autor (2010)

O vírus de RNAdf do fungo *Magnaporthe oryzae*, recentemente sequenciado, possui 5193 pares de base. Como apenas uma única banda foi apresentada no gel, acredita-se que esse vírus é pertencente da família Totiviridae (MAEJIMA *et al.*, 2008), pois além do sequenciamento do genoma e análise das subunidades da proteína RDRP, este é um critério que possibilita a classificação taxonômica destes vírus em nível de família (MERTENS, 2004).

O vírus PoV-1, do basidiomiceto *Pleurotus ostreatus*, possui dois segmentos de 2,3 kb e 2,2 kb, cada um contendo uma ORF na fita positiva (codificante), o que possibilita enquadrar esse vírus na família Partitiviridae. Após o sequenciamento dessas duas moléculas e análise computacional dos aminoácidos deduzidos das ORFs, observou-se uma alta similaridade com as proteínas encontradas na família Partitiviridae. Com base nisso, e pelo fato do vírus infectar um fungo, ele foi inserido no gênero *Partitivirus* (LIM *et al.*, 2004).

Em *Fusarium graminearum* encontrou-se uma molécula de RNAdf de 7,5 kb relacionada com hipovirulência no trigo. Após o sequenciamento parcial de dois clones dela, não foram encontraram os 8 motivos conservados para a RDRP, já relatados em outros vírus. Uma identificação taxonômica com outros vírus de RNAdf não foi possível, provavelmente pela grande diversidade de nucleotídeos das regiões sequenciadas (CHU *et al.*, 2002).

O sequenciamento do vírus EfV1 (*“Epichloe festucae virus 1”*), de 5109 nucleotídeos, revelou a existência de 2 ORFs comuns para vírus da família Totiviridae: a primeira codifica para a CP e a segunda para a RDRP. Ambas apresentaram homologia com proteínas de vírus desta família, e os 8 motivos conservados em replicases de vírus de RNA foram encontrados na ORF 2 (ROMO *et al.*, 2006). Os autores também encontraram isolados de *E. festucae* em diferentes regiões da Espanha contendo moléculas de RNAdf. Estas apresentavam 5,1 kb e hibridaram com EfV1 após “Northern blotting” com sondas específicas para este vírus. Isto sugere que além da alta incidência do vírus, ele está geograficamente espalhado nesta espécie em diferentes ecossistemas.

Apesar do tamanho do genoma do vírus de *G. citricarpa* estar mais próximo do descrito para a família Partitiviridae, a presença de um único fragmento de RNAdf indica que ele pertence à família Totiviridae. O sequenciamento desse genoma, assim como a análise das regiões 3’UTR (cauda poli-A) e 5’UTR são importantes para uma confirmação da posição taxonômica destes micovírus, pois já foi relatado que vírus da família Totiviridae possuem um segmento de 4,6 a 6,7 kb, enquanto que da família Partitiviridae esse tamanho se encontra entre 1,4 a 3,0 kb (WICKNER *et al.*, 2000).

4.2 Obtenção das linhagens isogênicas

As três formas de obtenção de isogenia no fungo *G. citricarpa* testadas foram cura de linhagens por ciclohexamida, repiques de ponta de hifa em temperatura moderadamente elevada (estresse térmico) e anastomose de hifas.

4.2.1 Cura do RNAdf em *G. citricarpa*

4.2.1.1 Ciclohexamida

As linhagens relacionadas no Quadro 1, que apresentam RNAdf, foram avaliadas quanto às consequências de ciclohexamida adicionada ao meio de cultura.

O ensaio com ciclohexamida não forneceu resultados positivos – as linhagens que foram tratadas com essa substância, inclusive na menor concentração utilizada (0,5 µg/µL), não apresentaram crescimento mesmo após 30 dias, incubadas a 28° C. Desta forma, foi verificado que esta substância inibe completamente o desenvolvimento desta espécie.

Um isolado de *Endothia parasítica* foi curado da sua infecção por RNAdf utilizando ciclohexamida. Dois outros isolados não foram curados, possivelmente devido a uma alta concentração do vírus nos hospedeiros. As linhagens curadas apresentaram aumento na virulência, o que sugere que um fenótipo hipovirulento está associado a este RNAdf (FULBRIGHT, 1984).

Três isolados de *Fusarium oxysporum* contendo RNAdf (1, 3 e 6) foram cultivados com ciclohexamida acrescentada ao meio, em concentrações variadas (15, 20, 40, 60, 140 e 280 µg/ml). Nenhuma tentativa de cura resultou em linhagens livres de RNAdf, e o crescimento das linhagens foi mais lento nas placas com maior concentração de ciclohexamida (KILIC, 1998).

A cura de um isolado do fungo *Nectria radicicola* de seus quatro tipos de RNAdf (L1, L2, M e S) foi obtida após mais de 3000 tentativas com o uso de ciclohexamida (10 ppm). As linhagens livres dos vírus L2, M e S não mostraram diferenças significantes na morfologia geral da colônia. No entanto, o isolado que foi curado do vírus L1 cresceu com uma coloração branca e não mostrou sintomas de virulência em testes de patogenicidade (AHN e LEE, 2001), o que sugere a associação do vírus com hipervirulência do fungo.

O isolado BK18 do fungo *Chalara elegans* foi submetido ao tratamento com ciclohexamida (5 e 10 µg/ml) para tentativa de eliminar seu RNAdf. Após dois terços da placa estar coberta pelo micélio fúngico, “plugs” da margem da colônia foram transferidos a novas placas com ciclohexamida na mesma concentração, por 4 gerações. O indivíduo não foi curado, pois o padrão de bandas observado em gel de agarose foi o mesmo do isolado BK18 selvagem (PARK, CHEN e PUNJA, 2006).

4.2.1.2 Repique de ponta de hifa em cultura a 35° C

Resultados positivos foram observados em relação ao estresse térmico (Quadro 6). Apesar de grande parte das repetições desse experimento ter sido negativa devido à alta sensibilidade da espécie *G. citricarpa* a mudanças bruscas de temperatura (Figura 4), os isolados PC7LD6 e ECLaP apresentaram setorização (Figuras 5 e 6). Os setores obtidos tiveram seus ácidos nucléicos totais extraídos para se verificar o sucesso do protocolo de cura do vírus (Figuras 7 e 8).

Isolado	Crescimento a 35° C	Setorização a 28 °C	Presença de bandas de RNAdf
PC33/05	-	-	-
ECLAP	+	+ (Setor A)	-
		+ (Setor B)	-
		+ (Setor C)	-
		+ (Setor D)	+
		+ (Setor E)	+
PC3C	-	-	-
PCIAC19/02	+	-	-
PC7LD6	+	+ (Setor 1)	-
		+ (Setor 2)	-
		+ (Setor 3)	-
		+ (Setor 4)	-
		+ (Setor 5)	-
		+ (Setor 6)	-
PC28/05	-	-	-
PC7LE10	-	-	-

QUADRO 6 – RESULTADOS DO EXPERIMENTO DE CURA APÓS ESTRESSE TÉRMICO E REPIQUES DE PONTAS DE HIFA PARA TODOS OS ISOLADOS TESTADOS

NOTA: (+) presente, (-) ausente

FONTE: O Autor (2010).

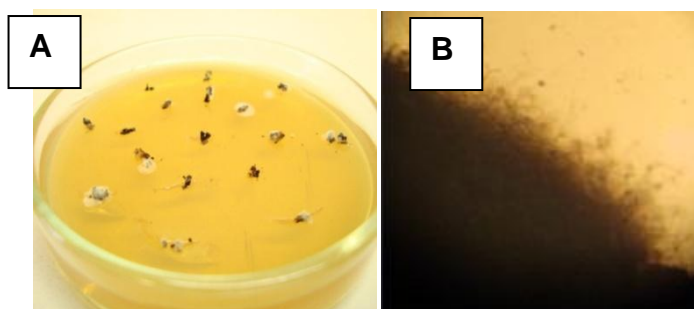


FIGURA 4 – MORFOLOGIA DO ISOLADO ECLaP APÓS 21 DIAS A 35° C
 NOTA: A: aparência macroscópica das colônias. B: micélio observado com lupa, aumento de 4x.
 FONTE: O Autor (2010).

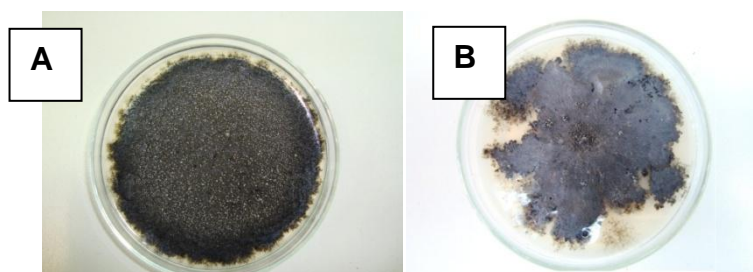


FIGURA 5 – MORFOLOGIA DO ISOLADO ECLaP
 NOTA: A: colônia cultivada a 28 °C. B: colônia obtida após 2 gerações a 35°C
 FONTE: O Autor (2010).

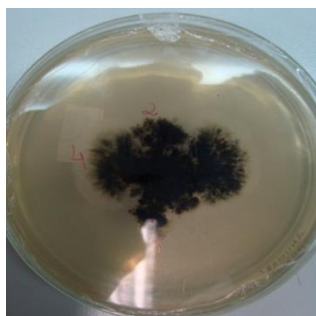


FIGURA 6 – MORFOLOGIA DO ISOLADO PC7LD6 CULTIVADA A 35 °C POR 21 DIAS
 Fonte: O Autor (2010).

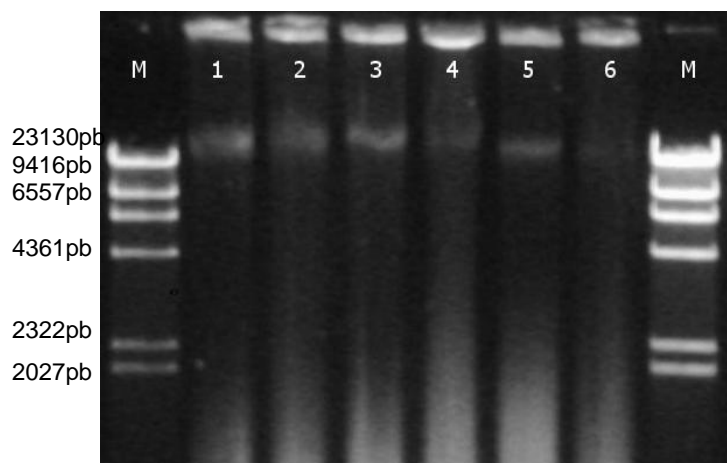


FIGURA 7 – ELETROFORESE DOS ÁCIDOS NUCLÉICOS TOTAIS DOS SETORES DO ISOLADO PC7LD6

NOTA: M: DNA do fago λ clivado com *Hind* III. Números de 1 a 6 indicam os setores, sem RNAdf
 FONTE: O Autor (2010).

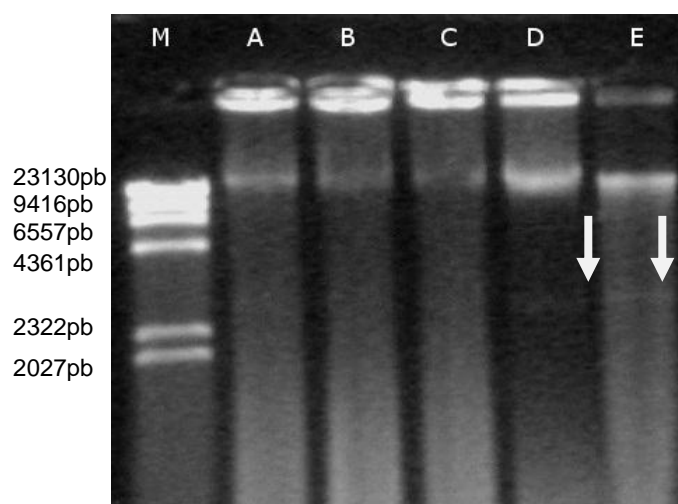


FIGURA 8 – ELETROFORESE DOS ÁCIDOS NUCLÉICOS TOTAIS DOS SETORES DO ISOLADO ECLaP

NOTA: M: DNA do fago λ clivado com *Hind* III. Canaletas D e E revelam bandas de RNAdf, enquanto que as outras, não. Setas indicam bandas de RNAdf
 FONTE: O Autor (2010).

A banda de RNAdf não foi observada em nenhum dos setores do isolado PC7LD6 (Figura 7).

Cinco setores obtidos a partir do isolado ECLaP foram investigados para averiguar a possível cura do RNAdf. Destes, em três não foi possível identificar banda de RNAdf após eletroforese em gel de agarose. A partir dos ácidos nucleicos purificados de dois setores, foi possível identificar bandas tênues de RNAdf (Figura

8). Portanto, este protocolo apresenta uma taxa de sucesso variável para *G. citricarpa*. O estresse térmico provavelmente diminuiu a concentração do vírus no fungo, e ocasionou a eliminação dele em alguns casos.

Esse fato corrobora com os resultados obtidos com a caracterização morfológica do tamanho das colônias observadas. Estatisticamente, após a medida do tamanho da colônia de 15 dias, os setores de 1 a 6 do isolado PC7LD6 não formaram um grupo que contrasta com o isolado selvagem (APÊNDICE 1, FIGURA 9).

A mesma observação foi feita no isolado ECLaP. Não há diferença estatística que envolva o tamanho da colônia com diferentes concentrações de RNAdf entre seus setores. Inclusive, os setores D e E, que não perderam o vírus durante as gerações em que foram submetidos a estresse térmico, também mostram semelhança entre os isolados em que a banda de RNAdf não foi detectada em gel de agarose e o isolado original que não sofreu tratamento (APÊNDICE 2, FIGURA 9).

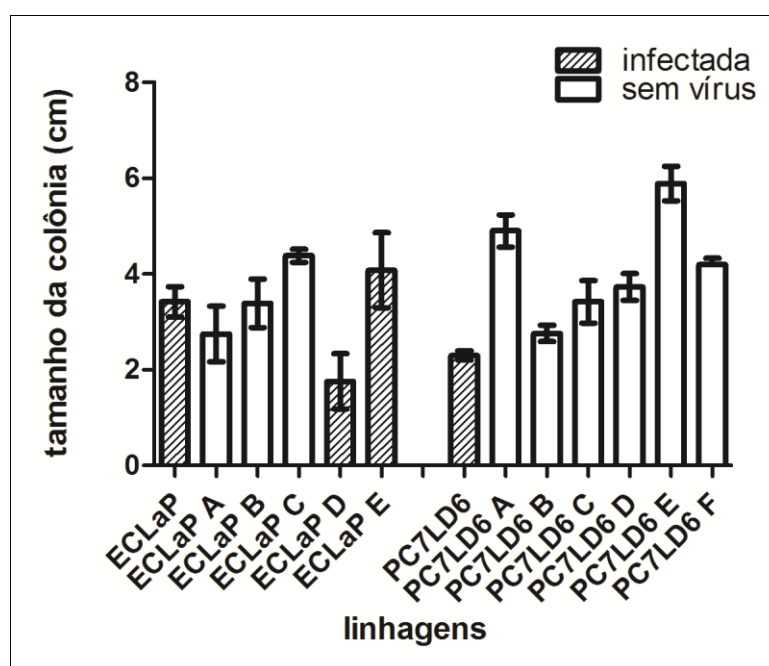


FIGURA 9 – TAMANHO DA COLÔNIA DOS ISOLADOS SELVAGENS E RESPECTIVOS SETORES, APÓS 15 DIAS DE CULTURA
FONTE: O Autor (2010).

Trabalhos anteriores relataram a obtenção de setores livres de RNAdf de isolados de *G. citricarpa* submetidos ao tratamento de cura por estresse térmico (SILVA, 2008). No entanto, uma investigação posterior destes setores mostrou a banda de RNAdf presente em gel de agarose (SILVANO, 2008). A autora considera que este protocolo não é eficaz para eliminar o vírus dessa espécie de fungo, mas apenas para baixar a concentração dele em níveis não visualizados em gel.

Aproximadamente 25 anos atrás, foi relatado que mutantes *c/o-* de *S. cerevisiae* não eram capazes de manter as formas L-B e L-C de RNAdf dentro de suas células, e que a baixa concentração dessas moléculas permitiu a visualização de outras formas desse material genético, então chamados de T e W, normalmente encontrados numa concentração baixa. Quando essas linhagens foram mantidas a 37°C, houve um aumento de 10x na concentração destes RNAdf. (WESOLOWSKI e WICKNER, 1984)

A espécie *Cystofilobasidium infirmominiatum*, que apresenta micocinogenia resultante da presença de RNAdf, também foi curada através de estresse térmico. Linhagens micocinogênicas são imunes à toxina que elas mesmas secretam, mas matam células que não possuem as formas L e M de RNAdf. Indivíduos que não são capazes de matar os outros representaram 4% da população restante que foi submetida ao processo de cura. A maioria foi sensível à toxina secretada pelo isolado parental, o que é um indicativo que os RNAdf responsáveis por esse fenômeno foram eliminados (GOLUBEV *et al.*, 2003).

Secção de pontas de hifa foi feita para obter a cura em *Rosellinia necatrix*, além de crescimento em meio aveia empobrecido (apenas 1/5 da quantidade de aveia foi utilizada). O isolado w790, que foi curado, mostrou virulência e taxa de crescimento similares a outros isolados semelhantes. Quando w790 apresentava RNAdf, cresceu de forma mais lenta quando comparado com outras linhagens (IKEDA, NAKAMURA, MATSUMOTO, 2005).

Um isolado selvagem de *Aspergillus niger* com RNAdf, encontrado na Holanda, formou setores sem conídios e com taxa de crescimento reduzida. Observou-se que esse fenótipo anormal possui concentração de micovírus elevada quando comparada com o micélio adjacente da colônia, devido à intensidade das bandas de RNAdf. Este foi o único isolado que foi curado através de isolamento sequencial de ponta de hifa de um total de 10 indivíduos. (DIAPENINGEN, DEBETS e HOESKSTRA, 2007)

Um vírus de RNA_{df} que infecta o endofítico *Epichlõe festucae* foi identificado como pertencente a família Totiviridae. Após submeterem as linhagens infectadas a temperaturas elevadas (37° C), os autores observaram que ao invés da cura dos indivíduos, a concentração do vírus aumentou. Este fato sugere a destruição de mecanismos mantenedores da homeostase nas células (ROMO *et al.*, 2007).

A perda de “fitness” em populações de vírus é comum após vários eventos de gargalo, como consequência do acúmulo de mutações deletérias previstas pelo processo de Muller (Muller’s ratchet). Isso se deve a ausência de um mecanismo de revisão nas polimerases virais (IGLESIA e ELENA, 2007). O protocolo de cura por temperatura moderadamente elevada pode levar a um evento de gargalo na população dos micovírus. Em populações grandes, genomas contendo mutações reversas ou compensatórias são mais comuns, enquanto que isso pode não acontecer em populações pequenas. Os autores relatam que isso foi observado para o vírus do mosaico do pepino (CMV), em que cada evento de infecção de plantas por afídios era considerado como um potencial gargalo de garrafa. Essa foi a primeira vez que o processo de Muller foi relatado em fitovírus, enquanto que para micovírus essa relação nunca foi descrita.

4.2.2 Transmissão de RNA_{df} entre linhagens

Quatro isolados de *G. mangiferae* (EC13C, EC21C, ECOL13 e PG1515) foram testados com isolados de *G. citricarpa* (PC3C, PC7LD6 e PC7LE10) para se testar a compatibilidade entre eles. No entanto, em nenhum dos casos houve contato entre as hifas (FIGURA 10), impossibilitando o uso destes para os ensaios de transmissão.

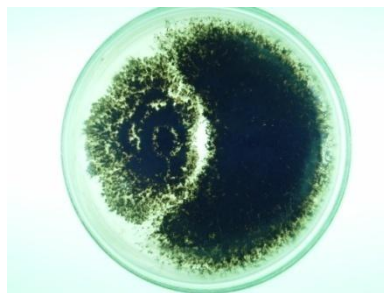


FIGURA 10 – TESTE DE COMPATIBILIDADE VEGETATIVA ENTRE ISOLADOS DE *Guignardia* sp
 NOTA: PC3C, À ESQUERDA, E EC13C, À DIREITA, APÓS 25 DIAS EM MC, 28°C
 FONTE: O Autor (2010).

Os ensaios de compatibilidade foram restringidos apenas entre isolados da espécie *G. citricarpa*, os quais apresentaram compatibilidade vegetativa (Figura 11).

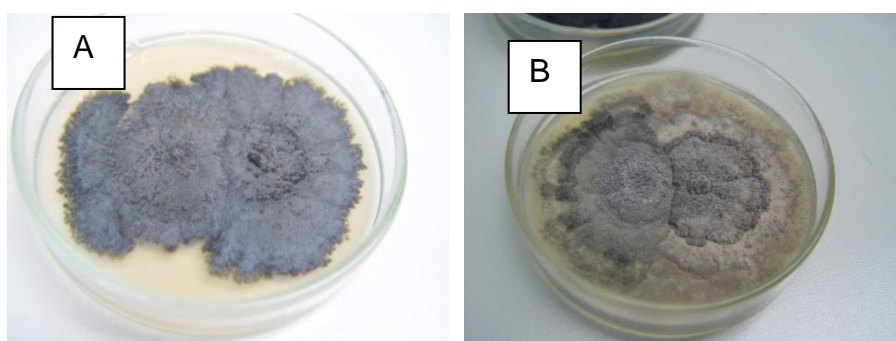


FIGURA 11 – TESTE DE COMPATIBILIDADE ENTRE ISOLADOS DE *G. citricarpa*
 NOTA: A: PC1AC19/02 pareada com PC3G, B: PC1AC19/02 pareada com PC13/96. APÓS 25 DIAS EM MC, 28°C
 FONTE: O Autor (2010).

Alvarez *et al.* (2009) relatou a dificuldade em se obter marcadores morfológicos de rápida identificação, como crescimento, morfologia da colônia ou coloração, por exemplo, para a espécie *G. citricarpa*.

Tentou-se a identificação de bandas de RAPD que fossem capazes de diferenciar esses indivíduos. No entanto, o uso dos “primers” OPX11, OPX14, OPX17 e OPX19 não foi capaz de separar intraespecificamente os isolados estudados. Esses dados corroboram com os obtidos por STRINGARI (2009), em que o sequenciamento das regiões ITS e EF não mostraram variabilidade entre isolados, e os marcadores RAPD permitiram apenas detectar a baixa variabilidade entre

isolados de *G. citricarpa* sem, entretanto, serem observados grupos com bom suporte “bootstrap”.

Um marcador morfológico descrito por Baayen *et al.*, (2002), foi definido para esse fungo. Segundo os autores, quando *G. citricarpa* é cultivada em Meio Aveia pH 5,8 a 22° C, na ausência de luz, após 7 ou 10 dias, pode-se observar um halo amarelo ao redor da colônia. STRINGARI, 2009, também estudou esse marcador e observou que alguns isolados apresentam falso-negativos, ou seja, mesmo pertencendo a essa espécie, não formam halo: 12 indivíduos com essas características foram utilizados para formar o grupo de isolados não portadores de RNAdf (não formadores de halo), ensaiados com PC33/05, portador de RNAdf (formador de halo).

O ensaio de compatibilidade apresentou 100% de sucesso entre esses grupos (FIGURA 12).

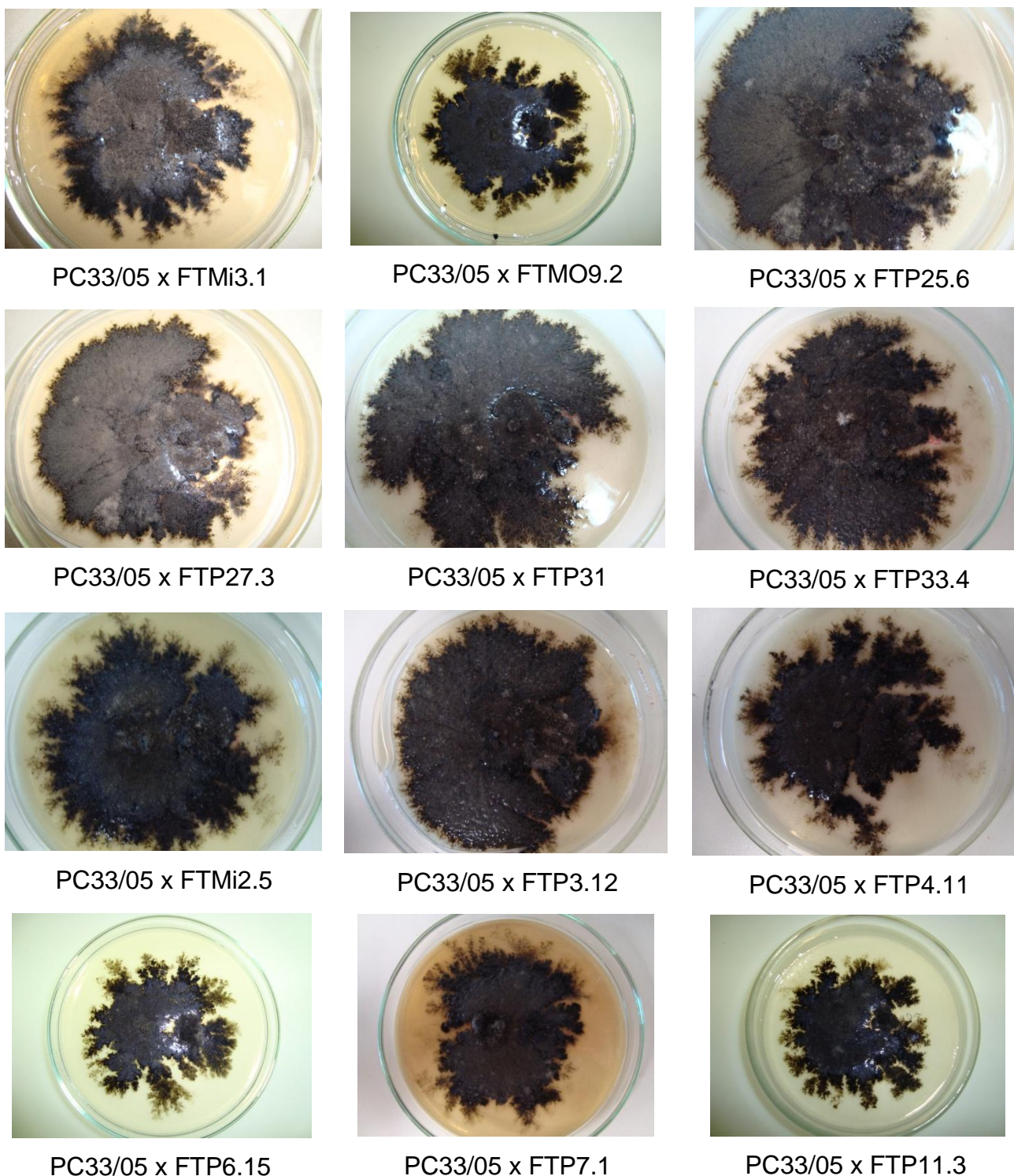


FIGURA 12 – ENSAIO DE COMPATIBILIDADE ENTRE ISOLADOS DE *G. citricarpa*.

NOTA: PC33/05 à esquerda e isolados não formadores de halo à direita, após 25 dias em mc, 28°C.

FONTE: O Autor (2010).

Foi feita uma solução de esporos da região de contato entre os isolados que foi vertida em 108 placas. Após quatro dias de incubação a 28°C, observou-se o crescimento de aproximadamente 2500 colônias monospóricas dos 12 ensaios (FIGURA 13).



FIGURA 13 – COLÔNIAS MONOSPÓRICAS OBTIDAS ENTRE PC33/05 E FTMI2.5
FONTE: O Autor (2010).

As colônias monospóricas resultantes foram incubadas em placas com Meio Aveia, pH 5,8, a 22° C, no escuro. Após 7 e 10 dias de crescimento, foram analisadas quanto a ausência de halo (Figura 14), pois os isolados de *G. citricarpa* que são considerados falso-negativos para este marcador são aqueles que devem ter recebido o vírus de PC33/05.

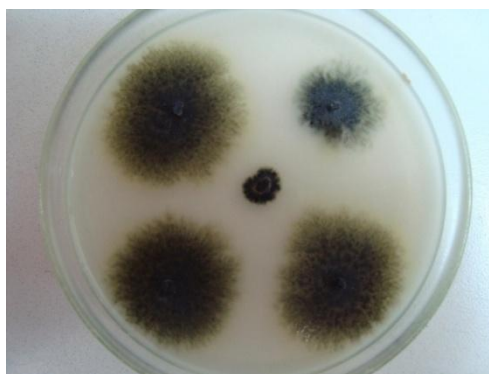


FIGURA 14 – COLÔNIAS REPICADAS EM MEIO AVEIA PARA AVALIAÇÃO DO MARCADOR MORFOLÓGICO
FONTE: O Autor (2010).

Dentre as 2500 colônias, apenas 27 pertencentes a 4 isolados (FTMi2.5, FTMi3.1, FTP7.1 e FTP11.3) não apresentaram halo e foram investigadas quanto a presença de RNAdf. Apenas 7 (28,92%) possivelmente receberam o RNAdf (TABELA 1, FIGURA 15).

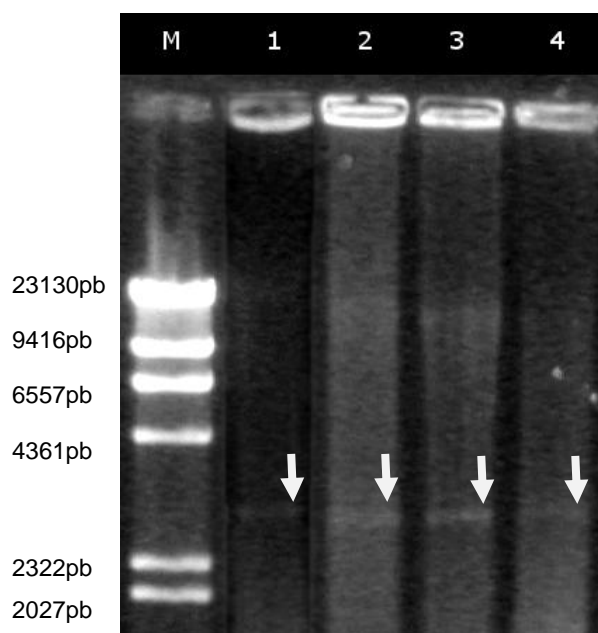


FIGURA 15 – ÁCIDOS NUCLEÍCOS TOTAIS DOS ISOLADOS QUE NÃO APRESENTARAM HALO

NOTA: M : DNA do fago λ clivado com *Hind* III. 1: FTMi2.5. 2: FTMi3.1. 3: FTP7.1. 4: FTP11.3. Setas indicam bandas de RNAdf.

FONTE: O Autor (2010).

TABELA 1 – RESULTADOS DO EXPERIMENTO DE TRANSMISSÃO

Isolado	Colônias monospóricas sem halo	Colônias que receberam o vírus
FTMi2.5	8	3
FTMi3.1	4	1
FTP7.1	7	1
FTP11.3	8	2
Total	27 (100%)	7 (28,92%)

Fonte: O Autor (2010).

Após a realização do teste Tukey para determinar a influência do vírus de RNAdf na taxa de crescimento das colônias infectadas, foi possível criar dois grupos bem definidos, em que o isolado sem vírus apresenta maior crescimento radial do que seus respectivos isogênicos, com vírus (APÊNDICES 3, 4 e 5, FIGURA 16).

Uma linhagem isogênica de FTP11.3, que apresentou a banda de RNAdf num primeiro momento, perdeu o vírus espontaneamente. Isso foi percebido após a comparação das medidas das colônias, pois ela agrupou com o isolado selvagem, (APÊNDICE 6, FIGURA 16). Após uma nova investigação de seus ácidos nucleicos totais, percebeu-se a ausência da banda de RNAdf.

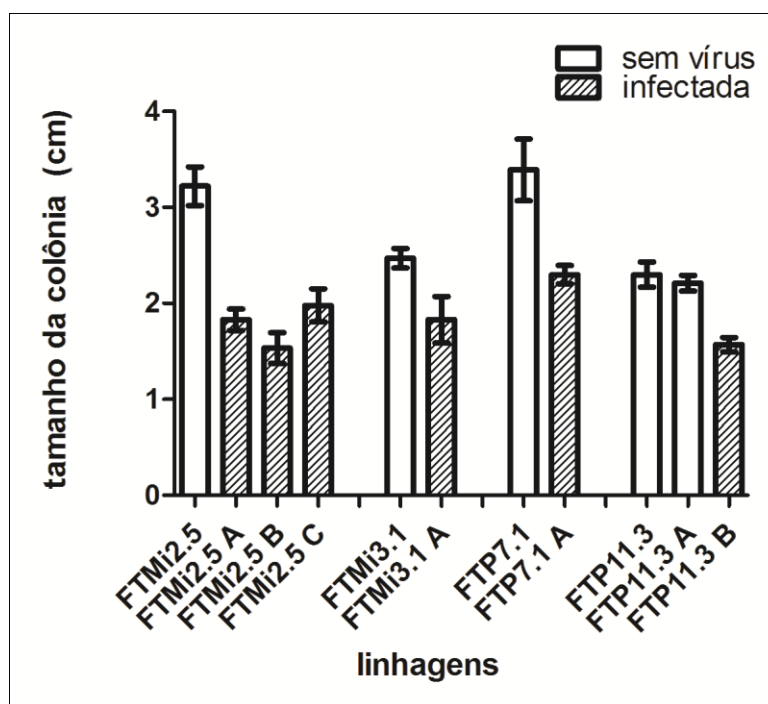


FIGURA 16 – TAMANHO DA COLÔNIA DOS ISOLADOS SELVAGENS E RESPECTIVAS COLÔNIAS QUE RECEBERAM O VÍRUS, APÓS 15 DIAS DE CRESCIMENTO

FONTE: O Autor (2010).

Geneticamente, o que ocasiona que a população de vírus de um clone se comporte de maneira diferente da população existente em outros hospedeiros, quando sob as mesmas condições ambientais, é a deriva genética viral. Cada vez que um afídio transmitiu o vírus do mosaico do pepino (CMV) para o hospedeiro vegetal, houve uma perda de 35% do fitness da população resultante (IGLESIA e ELENA, 2007). Tanto no trabalho descrito pelos dois autores como nos experimentos realizados com *G. citricarpa*, tratou-se de transmissão horizontal do vírus para diferentes indivíduos.

Em transmissões horizontais, gargalos surgidos nas populações são bastante severos, indicando que o efeito fundador aliado com a deriva genética é

importantíssimo quando se modela a evolução de vírus (BETANCOURT *et al.*, 2008).

Micovírus não são capazes de entrar nas células hospedeiras de forma extracelular, pois não secretam nenhuma enzima que poderia realizar essa ação. Eles são transmitidos intracelularmente durante a divisão celular, esporogenese e fusão celular (NUSS, 2005).

A transmissão de vírus de RNAdf entre outros isolados é um fenômeno altamente variável. A ocorrência de transmissão horizontal foi verificada entre isolados homocarióticos e heterocarióticos de *Heterobasidium annosum*, tanto de pontas de hifa como por conídios. Isto contrasta com outros estudos em que a incompatibilidade vegetativa inibiu a transmissão viral (IHMARK, 2002).

RNAdf foi transmitido após anastomose entre diferentes isolados de *Fusarium graminearum*. Colônias infectadas compartilharam o mesmo fenótipo que a colônia de onde o vírus veio. Esse fenótipo consistiu de crescimento lento, bordas irregulares da colônia e uma coloração vermelho-escura (CHU, 2002).

Foi observada uma frequência de 10% de sucesso em tentativas de transmissão em *Helicobasidium mompa*, o fungo que causa uma podridão na raiz de macieiras, quando um isolado doador dicariótico foi pareado com dois isolados monocarióticos. O indivíduo recém infectado foi então usado como doador para outros doze isolados, todos monocarióticos, dos quais sete receberam o vírus. Não houve diferenças morfológicas entre as linhagens isogênicas, no entanto, quando elas foram inoculadas em *Malus prunifolia*, a intensidade da virulência foi muito mais baixa quando comparada com a inoculação de fungos sem vírus (SUZAKI *et al.*, 2005).

Foi possível curar duas linhagens de *Rosellinia necatrix* de múltiplos fragmentos de RNAdf através de secções de pontas de hifa, e as reinfetar novamente por pareamento com os isolados originais. Essas linhagens foram as únicas levemente virulentas, e como elas mostraram um aumento na virulência quando foram consideradas livres de RNA, concluiu-se que o vírus foi responsável por essa característica (IKEDA, NAKAMURA e MATSUMOTO, 2005).

Linhagens de *C. parasitica*, *Phomopsis* tipo-G e *Valsa cerastoperma* foram infectadas com o vírus CHV1-EP713, o vírus responsável pela hipovirulência em *C. parasitica*. Tanto biolística de um clone de cDNA quanto anastomose foram bem sucedidos, e as linhagens recipientes manifestaram morfologia similares às suas

respectivas doadoras – níveis diferentes de hifas aéreas, taxas diferentes de esporulação (tanto aumento quanto diminuição foi observada), margens irregulares das colônias e taxas de crescimento reduzidas (SASAKI *et al.*, 2002).

Em *Sclerotinia sclerotiorum* foi relatada a presença de um único RNAdf, possivelmente da família Totiviridae por apresentar uma única banda, que não foi transmitido por esporos sexuais para outras linhagens. No entanto, resultados positivos foram observados para anastomose (XIE *et al.*, 2006).

Entretanto, não é sempre que resultados positivos são encontrados para a transmissão. No patógeno de batata *Phytophthora infestans*, um oomiceto, a transmissão e a cura de RNAdf não foram realizadas, portanto fica impossível determinar a influência do vírus para este organismo. (CAI *et al.*, 2009).

Um estudo clássico, envolvendo controle biológico e vírus de fungos, foi feito com a espécie *C. parasitica*, responsável pelo cancro da castanheira. Observou-se que linhagens que não possuíam vírus de RNAdf eram as responsáveis pela causa da doença. Algum tempo depois que se realizou transmissão do RNAdf para as colônias de *C. parasitica* encontradas causando a doença nas árvores, percebeu-se que as lesões regrediram consideravelmente e as árvores foram curadas (ANAGNOSTAKIS, 1982).

A sequência de nucleotídeos da ORF codificadora para a RDRP do vírus encontrado em *Helicobasidium mompa* foi determinada. Depois que repiques pareados foram feitos entre linhagens portadoras e livres de RNAdf, os autores realizaram uma reação de Reverse Transcriptase-PCR para observar se a sequência para aquela ORF foi amplificada, e assim garantiram o sucesso da transmissão viral (SUZAKI *et al.*, 2005).

4.3 Obtenção de cDNA

Para que se possa fazer o sequenciamento do RNAdf é necessária a obtenção do DNA complementar (cDNA) à sequência de RNA.

O isolado PC33/05, previamente descrito, foi repicado e submetido a extração de ácidos nucléicos totais com uso de fenol ácido, e a solução obtida foi tratada com as enzimas DNase e Nuclease S1, até obtenção de uma concentração de 50 a 100 ng/μL de RNAdf.

Utilizando o protocolo descrito por Park *et al.* (2004) para a obtenção de cDNA não foi observado nenhum produto de amplificação. Com uma modificação no protocolo descrito pelos autores, ou seja, aumento da concentração de primers para 2 μL (3 μg/μL), foi possível produzir cDNA a partir do RNAdf de *G. citricarpa*. (Figura 17).

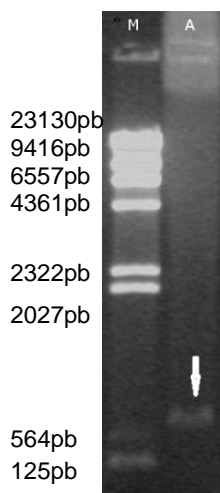


FIGURA 17 – PRODUÇÃO DE cDNA APÓS RT-PCR DE RNAdf DE *G. citricarpa*

NOTA: M: DNA do fago λ clivado com *Hind* III. A: seta indica o produto de amplificação, o cDNA.

FONTE: O autor (2010).

Este cDNA seria utilizado para o sequenciamento porém dificuldades técnicas e falta de tempo hábil inviabilizaram a obtenção do genoma sequenciado destas partículas virais.

4.4 Análise de sequências de nucleotídeos e aminoácidos de genes de vírus da família Totiviridae

Considerando a possibilidade de produzir um oligonucleotídeo iniciador específico para a identificação de vírus da família Totiviridae, várias sequências genômicas destes vírus foram pesquisadas e importadas do “GenBank”.

As sequências de dois genes, presentes nos genomas destes vírus foram avaliadas. Foram investigados os genes codificantes do capsídeo protéico e da RDRP. Após alinhamento com o Programa Clustal W (LARKING *et al.*, 2007) foi observado que as sequências de nucleotídeos não possuem uma região conservada o suficiente para o desenho dos oligonucleotídeos iniciadores.

Estas sequências de nucleotídeos obtidas no “GenBank”, bem como as respectivas sequências de aminoácidos, foram utilizadas para análise filogenética.

Após obtenção dos alinhamentos das sequências codificantes completas e das possíveis proteínas codificadas das duas ORFs presentes nos micovírus pertencentes à família Totiviridae, foram obtidas as topologias das árvores filogenéticas baseadas em parcimônia (Figuras 18, 19, 20 e 21). Considerando a possibilidade da existência de co-evolução entre vírus e seu hospedeiro (GHABRIAL, 1998), foi feita uma análise filogenética das regiões ITS1-5,8S-ITS2 das espécies fúngicas portadoras destas partículas virais (Figura 22). Para estas árvores, os vírus foram nomeados de acordo com o Quadro 7.

Nomenclatura	Nº de Acesso	Indivíduo	Hospedeiro
AspNid	EU289895.1	<i>Aspergillus mycovirus</i> 178	<i>Aspergillus nidulans</i>
BlkRsp	NC_009890.1	Black Raspberry totivirus F	<i>Rubus occidentalis</i>
BotFuk	NC_009224.1	<i>Botryotinia fuckeliana</i> totivirus 1	<i>Botryotinia fuckeliana</i>
ConMin	NC_007523.1	<i>Coniothyrium minitans</i> RNA virus	<i>Coniothyrium minitans</i>
EpiFes	AM261427.1	<i>Epichloe festucae</i> virus 1	<i>Epichloe festucae</i>
GremAbi	NC_003876.1	<i>Gremmeniella abietina</i> RNA virus L1	<i>Gremmeniella abietina</i>
GreAbi	NC_005965.1	<i>Gremmeniella abietina</i> RNA virus L2	<i>Gremmeniella abietina</i>
HelMom	AB253329.1	<i>Helicobasidium mompa</i> virus N10	<i>Helicobasidium mompa</i>
HelVic	NC_003607.2	<i>Helminthosporium victoriae</i> 190S	<i>Helminthosporium victoriae</i>
MagOry	NC_006367.1	<i>Magnaporthe oryzae</i> virus 1	<i>Magnaporthe oryzae</i>
SphSap	AF038665.1	<i>Sphaeropsis sapinea</i> RNA virus 1	<i>Sphaeropsis sapinea</i>
SphSap	NC_001964.1	<i>Sphaeropsis sapinea</i> RNA virus 2	<i>Sphaeropsis sapinea</i>
SacCer	NC_003745.1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> L-A	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
ThiBas	NC_005883.1	<i>Thielaviopsis basicola</i> RNA virus 1	<i>Thielaviopsis basicola</i>
ZygBai	NC_003874.1	<i>Zygosaccharomyces bailii</i> virus Z	<i>Zygosaccharomyces bailii</i>

QUADRO 7 – NOMENCLATURA E NÚMERO DE ACESSO NO “GENBANK” DOS INDIVÍDUOS UTILIZADOS PARA ANÁLISE FILOGENÉTICA
 FONTE: O Autor (2010).

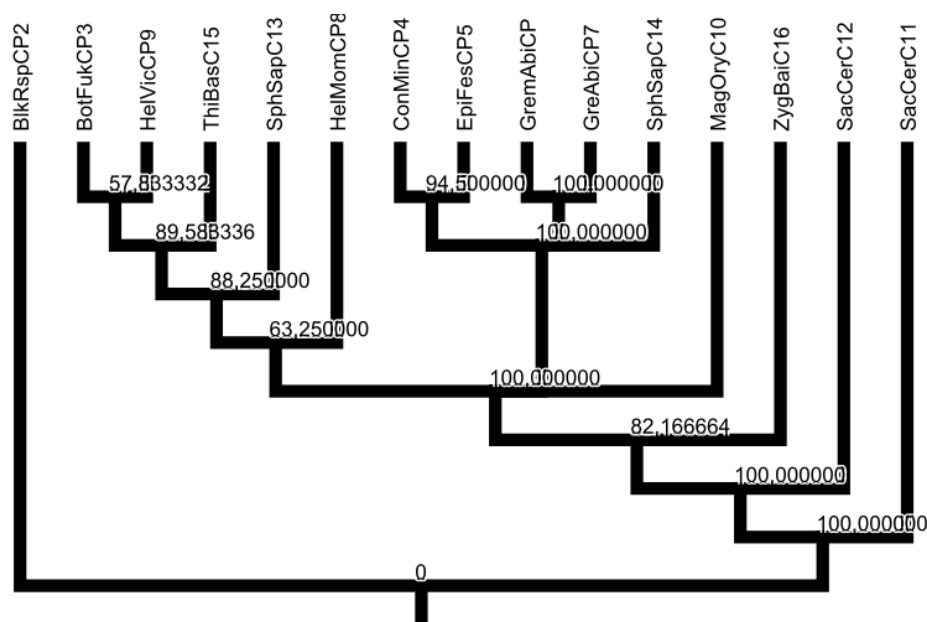


FIGURA 18 – ÁRVORE FILOGENÉTICA DE PARCIMÔNIA CONSTRUÍDA A PARTIR DO ALINHAMENTO DA SEQUÊNCIA DE NUCLEOTÍDEOS DA ORF PROTEÍNA DO CAPSÍDEO

NOTA: Árvore gerada com 1000 bootstraps e os valores representados demonstram os índices de consistência dos ramos

FONTE: O autor (2010)

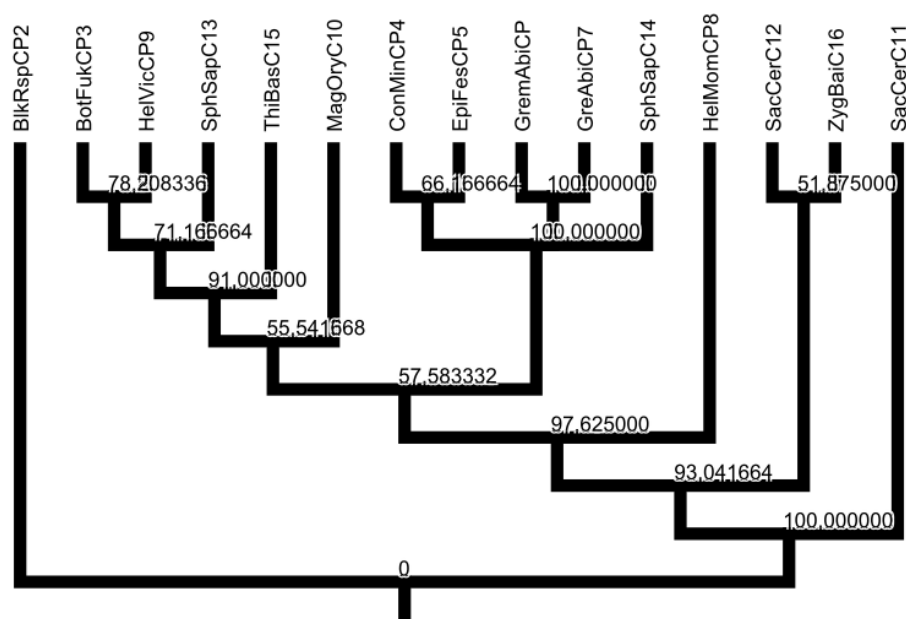


FIGURA 19 – ÁRVORE FILOGENÉTICA DE PARCIMÔNIA CONSTRUÍDA A PARTIR DO ALINHAMENTO DAS SEQUÊNCIAS DE AMINOÁCIDOS DAS PROTEÍNAS DO CAPSÍDEO

NOTA: Árvore gerada com 1000 bootstraps e os valores representados demonstram os índices de consistência dos ramos

FONTE: O autor (2010)

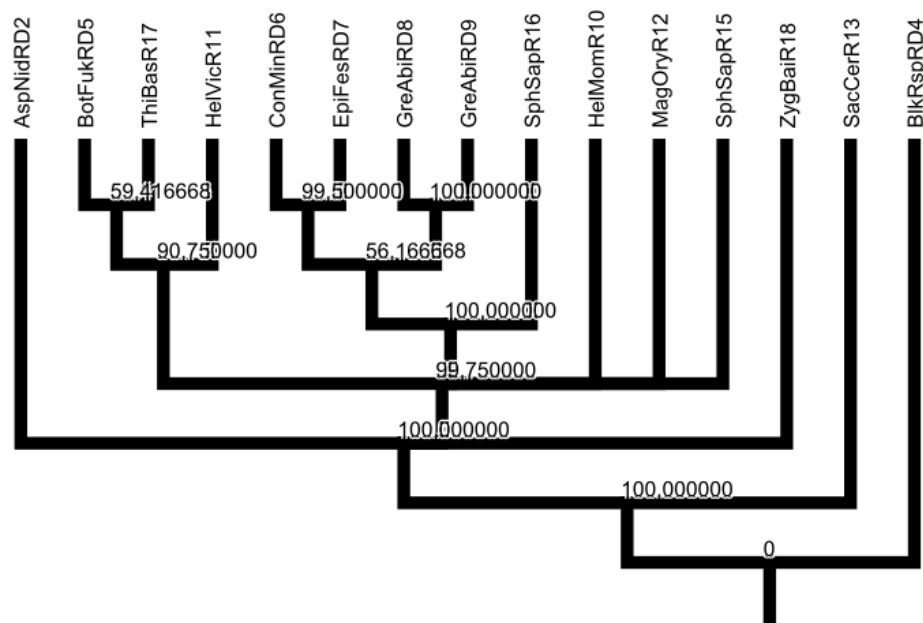


FIGURA 20 – ÁRVORE FILOGENÉTICA DE PARCIMÔNIA CONSTRUÍDA A PARTIR DO ALINHAMENTO DAS SEQUÊNCIA DE NUCLEOTÍDEOS DAS ORFS RNA POLIMERASES DEPENDENTES DE RNA

NOTA: Árvore gerada com 1000 bootstraps e os valores representados demonstram os índices de consistência dos ramos

FONTE: O autor (2010)

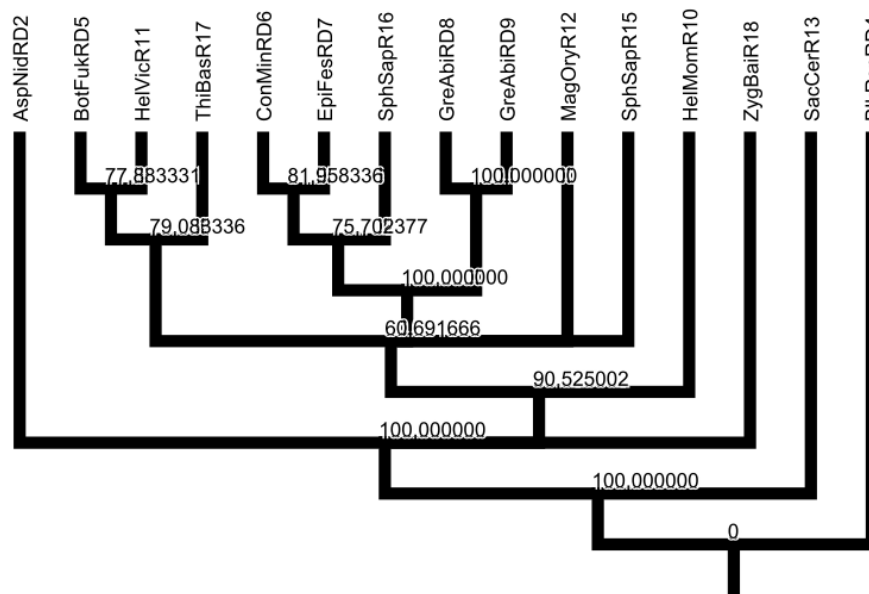


FIGURA 21 – ÁRVORE FILOGENÉTICA DE PARCIMÔNIA CONSTRUÍDA A PARTIR DO ALINHAMENTO DA SEQUÊNCIA DE AMINOÁCIDOS DAS RNA POLIMERASES DEPENDENTES DE RNA

NOTA: Árvore gerada com 1000 bootstraps e os valores representados demonstram os índices de consistência dos ramos

FONTE: O autor (2010)

É possível perceber que os dois principais grupos formados para a ORF CP consistem dos vírus *Botryotinia fuckeliana* totivirus 1, *Thielaviopsis basicola* RNA Virus 1 e *Helminthosporium victoriae* virus 190S, seguido de *Coniothyrium minitans* RNA virus, *Epichloe festucae* vírus 1, *Gremmeniella abietina* RNA virus L1 e L2, *Sphaeropsis sapinae* RNA virus 1 e *Magnaporthea oryzae* virus 1. Esses dois grandes grupos consistem de micovírus que infectam fungos filamentosos, todos fitopatogênicos. Em seguida, encontra-se os vírus de *Zygosaccharomyces bailii* e de *Saccharomyces cerevisiae*, ambos com pouca identidade filogenética em relação aos outros.

Os mesmos grandes grupos foram formados para a ORF RDRP, com pequenas variações: *Botryotinia fuckeliana* totivirus 1 continua relacionado com *Helminthosporium victoriae* virus 190S e *Thielaviopsis basicola* RNA Virus 1. *Coniothyrium minitans* RNA virus, *Epichloe festucae* virus 1, *Gremmeniella abietina* RNA virus L1 e L2, e *Sphaeropsis sapinae* RNA virus 1 continuam relacionados quando avaliados para essa sequência de nucleotídeos.

Após o sequenciamento do genoma do partitivirus PoV1 (*Pleurotus ostreatus* Virus 1), foi feita uma comparação filogenética das cadeias de aminoácidos que compõem as ORFs de seus dois genes. Os autores perceberam que PoV1 formava um clado distinto com outros partitivírus, além de se agruparem separadamente quando testadas com membros da família Totiviridae. Houve também uma baixa identidade da sequência de RDRP com outros vírus dessas duas famílias, que chegou a valores de até 4,5% (LIM *et al.*, 2004).

Observou-se co-infecção por dois membros da família Totiviridae num isolado de *Chalara elegans* (*Thielaviopsis basicola*) (PARK, DELANO e PUNJA, 2004). Os autores sequenciaram ambos os vírus e compararam as sequências de aminoácidos das RDRPs. Concluíram, a partir da árvore filogenética produzida, que os dois fragmentos de RNA_{df} estavam mais aparentados com outros totivirus que infectam fungos filamentosos, como *Sphaeropsis sapinea*, do que os totivirus encontrados em leveduras e protozoários

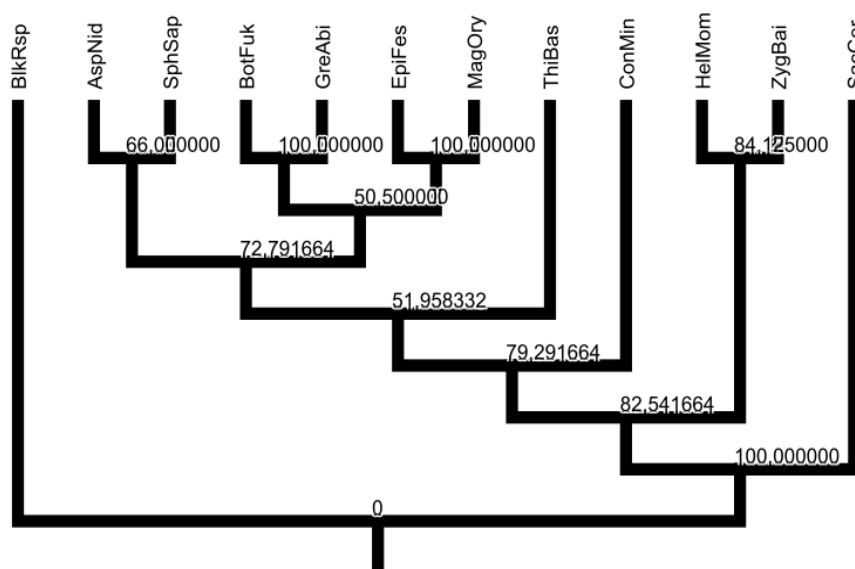


FIGURA 22 - ÁRVORE FILOGENÉTICA DE PARCIMÔNIA CONSTRUÍDA A PARTIR DO ALINHAMENTO DAS REGIÕES 1ITS-5,8S-2ITS DE FUNGOS PORTADORES DE TOTIVIRUS

NOTA: Árvore gerada com 1000 bootstraps e os valores representados demonstram os índices de consistência dos ramos

FONTE: O autor (2010)

PARK, DELANO e PUNJA (2004) fazem uma das poucas inferências de co-evolução entre vírus e fungos relatadas na literatura: propõem que, como os vírus de RNA_{df} na família Totiviridae podem ter estado presentes numa única célula antes da divergência entre fungos e protozoários (GHABRIAL, 1998), alguns elementos de RNA_{df} podem ter infectado uma célula fúngica antes da divergência entre as espécies *C. elegans* e *S. sapinea*, e então co-evoluído em seus hospedeiros respectivos, resultando em dois vírus diferentes com algum grau de homologia. No entanto, observando as figuras 20 e 21, observa-se que há maior relação entre as regiões ITS1-5,8S-ITS2 de *Aspergillus nidulans* e *Sphaeropsis sapinea*, enquanto que analisando a sequência de aminoácidos da RDRP, *T. basicola* está mais próxima da dupla *B. fuckeliana* e *Helminthosporium victoriae*, e *S. sapinea* possui uma identidade menor.

Estudos feitos com o vírus CeMV, que infecta o fungo *Chalara elegans*, possibilitaram os autores o classificar como membro da família Narnaviridae, por ele não apresentar capsídeo protéico. A única ORF dele, que codifica uma proteína com vários motivos conservados, assemelha-se a RDRP, com 34% de identidade com o vírus do fungo *Ophiostoma novo-ulmi*. Tanto sequências de aminoácidos como de

nucleotídeos apoiaram a relação próxima de CeMV com outros mitovírus (PARK, CHEN e PUNJA, 2005).

O cDNA completo do segmento L de SsDRV (*Sclerotinia sclerotiorum Debilitation associated RNA virus*) foi sequenciado e analisado (LIU *et al.*, 2008). Pelo fato desse segmento não apresentar homologia, após hibridação Northern, com o vírus SsDRV, os autores sugerem que ele representa um novo micovírus. Buscas por homologia desse vírus indicaram que a enzima RDRP desse vírus está relacionada com vários vírus animais pertencentes ao gênero *Hepevirus*, incluindo o vírus da hepatite E humana, suína e aviária, além de vírus de insetos HaSV e DpTV. É mais provável que o vírus SsDRV derivou independentemente de vírus de plantas, pois vertebrados e insetos não são hospedeiros do fungo *Sclerotinia sclerotiorum*.

Foi sugerida a criação de um novo gênero dentro da família Partitiviridae, *Cryspovirus*, para acomodar a classificação de um vírus de RNAdf proveniente do protozoário *Cryptosporidium parvum*, chamado CSpV1. Esse vírus não se agrupa dentro de nenhum gênero dessa família, pois análises filogenéticas indicam que os gêneros *Alphacryptovirus* assim como *Betacryptovirus* comportam vírus provenientes de plantas, e *Partitivirus*, vírus oriundos de fungos (GHABRIAL e NIBERT, 2009). Nesse último caso, o autor sugere que a formação de subclados dentro do gênero indica que micovírus tenham origens polifiléticas. CSpV1 está bem separado de todos esses gêneros nas árvores para as duas ORFs.

Análises de BLAST usando a RDRP e a CP de do vírus La de *S. cerevisiae* revelaram a existência de genes de Totiviridae em cinco espécies fúngicas: *P. stipitis*, *Penicillium marneffeii*, *D. hansenni*, *Uromyces appendiculatus* e *Candida parapsilosis*. Cada um dos genes fúngicos derivados de *Totivirus* possuíam uma ORF não interrompida. Os mRNA produzidos de RDRP aparecem como RNA polimerases II poliadeniladas nas bibliotecas de EST pesquisadas. O mesmo foi observado para os produtos dos genes de CP. Após a realização de testes filogenéticos de evolução neutra, revelou-se que esses genes fogem da neutralidade para uma seleção purificadora, consistente com a seleção purificadora que mantém a função gênica (TAYLOR e BRUENN, 2009).

5. CONCLUSÕES

- O protocolo de extração que forneceu a maior quantidade de RNAdf em *G. citricarpa*, numa maior pureza, foi o que utiliza fenol ácido (pH 4,7).
- O protocolo de cura de RNAdf por crescimento do fungo em meio com ciclohexamida não é viável para os isolados de *G. citricarpa* utilizados neste trabalho.
- O protocolo de cura de RNAdf por repiques de ponta de hifa e crescimento do fungo em temperatura moderadamente elevada (35 °C) pode gerar isolados de *G. citricarpa* curados do seu RNAdf. Isolados considerados isogênicos obtidos pela cura do RNAdf não apresentaram alterações morfológicas detectáveis. É possível que estas linhagens estejam com baixa concentração de vírus, não detectável em eletroforeses, e não totalmente curadas.
- O protocolo de transmissão horizontal de RNAdf é viável para a obtenção de linhagens isogênicas de *G. citricarpa*.
- Linhagens que receberam RNAdf pela transmissão apresentaram menor taxa de crescimento radial em placa de Petri que as respectivas linhagens selvagens isogênicas, não portadoras dos vírus.
- Foi possível obter cDNA do vírus de RNAdf de *G. citricarpa*.
- Não foi possível identificar semelhanças significativas entre as árvores filogenéticas dos vírus em relação à árvore obtida dos fungos hospedeiros. A análise dessa região não forneceu indícios de co-evolução entre vírus e hospedeiro.

6. REFERÊNCIAS

- AHN, I., LEE, Y. A viral double-stranded RNA up regulates the fungal virulence of *Nectria radicola*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**. 14, 496-507, 2001.
- ALVAREZ, T. M., MONTENEGRO, D. H., SILVA, T. M., ADAMOSKI, D., STRINGARI, D., GALLI-TERASAWA, L., GLIENKE, C., KAVA-CORDEIRO, V. Cure, transmission and modifications on dsRNA's purification protocol in *Guignardia citricarpa*. In: 55º Congresso Brasileiro de Genética, 2009, Águas de Lindóia - SP. Anais do 55º Congresso Brasileiro de Genética, 2009. p. 60-60
- ANAGNOSTAKIS, S. L. Biological Control of Chestnut Blight. *Science*, 215:466-471, 1982.
- AOKI, N., MORIYAMA, H., KODAMA, M., ARIE, T., TERAOKA, T., FUKUHARA, T. A novel mycovirus associated with four double-stranded RNAs affects host fungal growth in *Alternaria alternata*. *Virus Research*, 140: 179-187, 2009.
- AZEVEDO, J.L. Microrganismos endofíticos. In: MELO, I.S.; AZEVEDO, J.L. (Eds.). **Ecologia Microbiana**. Jaguariúna: Embrapa-CNPMA, 1998. p.117-137, 1998.
- BAAYEN, R.P.; BONANTS, P.J.M.; VERKLEY, G.; CARROLL, G.C.; VAN DER AA, H.A.; DE WEERDT, M.; VAN BROUWERSHAVEN, I.R.; SCHUTTE, G.C.; MACCHERONI JR., W.; GLIENKE DE BLANCO, C.; AZEVEDO, J.L. Nonpathogenic isolates of the citrus black spot fungus, *Guignardia citricarpa*, identified as a cosmopolitan endophyte of woody plants, *G. mangiferae* (*Phyllosticta capitalensis*), **Phytopathology**, St. Paul, v.92, n. 5, p. 464-477, 2002.
- BALDASSARI, R. B.; GOES, A.; SANTOS, J. M.; TIMOSSI, A. J. Microscopia eletrônica de varredura de isolados de *Guignardia citricarpa* obtidos de plantas cítricas. **Summa Phytopathologica**, Jaboticabal, v. 27, n. 1, p. 88-92, 2001.
- BALIJJJA, A., KVARNHEDEN, A., TURCHETTI, T. A non-phenol chloroform extraction of double-stranded RNA from plant and fungal tissues. **Journal of Virological Methods**, v. 152, p. 32-37, 2008.
- BECKER, Y. Evolution of viruses by acquisition of cellular RNA or DNA nucleotide sequences and genes: An introduction. **Virus Genes**, 21, 7-12, 2000.
- BELL, A.A.; WHEELER, M.H. Biosynthesis and functions of fungal melanins. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v.24, p. 411-451, 1986.
- BETANCOURT, M., FERRERES, A., FRAILE, A., GARCÍA-ARENAL, F., Estimation of the effective number of founders that initiate an infection after aphid transmission of a multipartite plant virus. **Journal of Virology**, 82,

12416-12421, 2008.

BOTTGER, E. C.; BLANAR M. A.; FLAVELL, R. A. Cyclohexamide, an inhibitor of protein synthesis, gamma-interferon induced expression of class-II messenger-RNA in macrophage cell line. *Immunogenetics*, 28, 215–220, 1988.

BOURETT, T.M.; HOWARD, R.J. *In vitro* development of penetration structures in the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 68, p. 329-342, 1990.

BRUENN, J. A., 2003. A structural and primary sequence comparison of the viral RNA-dependent RNA polymerases. **Nucleic Acids Reserach**, 31, 1821-1829, 2003.

BUCK, K.W. Fungal virology – An overview. In: **Fungal virology**. Ed. K.W. Buck, CRC Press Inc., Boca Raton, Florida, p. 1-84, 1986.

CAI, G., MYERS, K., HILLMAN, B.I., FRY, W.E., A novel virus of the late blight pathogens, *Phytophthora infestans*, with two RNA segments and a supergroup 1 RNA-dependent RNA polymerase. **Virology**, 392, 52-61, 2009.

CARROLL, G.C.; CARROLL, F. Studies on the incidence of coniferous endophytes in the Pacific Northwest. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 5, p. 3034-3043, 1978.

CATALANOTTO, C.; NOLAN, T.; COGONI, C. Homology effects in *Neurospora crassa*. **Federation of European Microbiological Societies**. v. 254, p. 182-189, 2006.

CHENG, J., JIANG, D., FU, Y., LI, G., PENG, Y., GHABRIAL, S.A., Molecular characterization of a dsRNA totivirus infecting the sclerotial parasite *Coniothyrium minitans*. **Virus Research** 93, 41-50, 2003.

CHRISTO, D. **Variabilidade Genética e Diferenciação Molecular de Isolados Endofíticos e Patogênicos de *Guignardia* spp e *Phyllosticta* sp.** Curitiba, 2002. 78p. Dissertação (Mestrado em Genética) Setor de Ciências Biológicas – Universidade Federal do Paraná.

CHOUDHARY, S.; LEE, H.C.; MAITI, M.; HE, Q.; CHENG, P.; LIU, Q.; LIU, Y. A double-stranded RNA response program important for RNA interference efficiency. **Molecular and Cellular Biology**, v.27, p.3995-4005, 2007.

CHU, Y.M.; JEON, J.J.; YEA, S.J.; KIM, Y.H.; YUN, S.H. LEE, Y.W.; KIM, K.H. Double-stranded RNA mycovirus from *Fusarium graminearum*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 68, p. 2529-2534, 2002.

COGONI, C.; MACINO, G. Isolation of quelling-defective (qde) mutants impaired in posttranscriptional transgene-induced gene silencing in *Neurospora crassa*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. v. 94, p. 10233-

10238, 1997.

COMPEL, P.; PAPP, I.; BIBO, M.; FEKETE, C.; HORNOR, L. Genetic interrelationships and genome organization of double-stranded RNA elements of *Fusarium poae*. **Virus Genes**, Dordrecht, v. 18, p. 49-56, 1999.

CROUS, P.W.; WINGFIELD, M.J.; FERREIRA, F.A.; ALFENAS, A. *Mycosphaerella parkii* and *Phyllosticta eucalyptorum*, two new species from eucalyptus leaves in Brazil. **Mycological Research**, Cambridge, v.97, p. 582-584, 1993.

DALZOTO, P.R.; GLIENKE-BLANCO, C.; KAVA-CORDEIRO, V.; RIBEIRO, J. Z.; KITAJIMA, E. W.; AZEVEDO, J. L. Horizontal transfer and hypovirulence associated with double-stranded RNA in *Beauveria bassiana*. **Mycological Research**. United Kingdom, v. 110, p. 1475-1481, 2006.

DE GUIDO, M.A., MINAFRA, A., SANTOMAURO, A., POLLASTRO, S., DE MICCOLIS, R.M., FARETRA, F. - Molecular characterization of mycoviruses from *Botryotinia fuckeliana*. **Plant Protection and Applied Microbiology**, University of Bari, Italy, 2007.

DEAN, R.A. Signal pathways and appressorium morphogenesis. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 35, p. 211-234, 1997.

DIAPENINGEN, A. D. V.; DEBETS, A. J. M.; HOEKSTRA, R. F. Dynamics of dsRNA mycoviruses in black *Aspergillus* populations. **Fungal Genetics and Biology**, United Kingdom, v. 43, p. 446-452, 2007.

DOHERTY, M., SANGANEE, K., KOZLAKIDIS, Z., COUTTS, R.H.A., BRASIER, C.M., BUCK, K.W. Molecular characterization of a Totivirus and a Partitivirus from the Genus *Ophiostoma*. **Journal of Phytopathology**, 155,188-192, 2007.

ELLISTON, J. E.. Characteristis of dsRNA-free and dsRNA-containing strains of *Endothia parasitica* in relation to hypovirulence. **Phytopathology**, v.75, p.151-158, 1985.

FIGUEIREDO, J.G., GOULIN, E.H., TANAKA, F., STRINGARI, D., KAVA-CORDEIRO, V., GALLI-TERASAWA, L.V., STAATS, C.C., SCHRANK, A., GLIENKE, C. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Guignardia citricarpa*. **Journal of Microbiological Methods**, 80, 143-147, 2010.

FULBRIGHT, D.W. Effect of elimination dsRNA in hypovirulent *Endothia parasitica*. **Phytopathology**, St. Paul, v.74, p. 722-724, 1984.

GHABRIAL, S. A. Origin, Adaptation and Evolutionary Pathways of Fungal Viruses. **Virus Genes**, 16:1, 119-131, 1998.

GHABRIAL, S. A., NIBERT, M. L. Victorivirus, a new genus of fungal viruses in

the family Totiviridae. *Archives of Virology* 154:373-379, 2009.

GHABRIAL, S. A., SUZUKI, N. Viruses of Plant Pathogenic Fungi. *Annual Reviews in Phytopathology*. 47:353-384, 2009

GLIENKE, C. **Variabilidade genética no fungo endófito *Guignardia citricarpa* Kiely detectada por RAPD**. Curitiba, 1995, 115p. Dissertação (Mestrado). Orientador: Prof. Dr. João Lúcio de Azevedo. Universidade Federal do Paraná.

GOES, A.; FEICHTENBERGER, E. Ocorrência da mancha preta causada por *Phyllosticta citricarpa* (McAlp.) VAN DER AA (*Guignardia citricarpa* Kiely) em pomares cítricos do Estado de São Paulo. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 18, p. 138, 1993.

GOLUBEV, W.I., PFEIFFER, I., CHURKINA, L.G., GOLUBEVA, E.W. Double-stranded RNA viruses in a mycotoxinogenic strain of *Cystofilobasidium infirmominiatum*. *Yeast Research*, 2003, 63-68.

GORBALENYA, A. E.. Origin of RNA viral genomes; approaching the problem by comparative sequence analysis. Pages 49-65. in: **Molecular basis of virus evolution**. eds. Cambridge University Press, Cambridge, 1995.

HALL, T. A. **BioEdit 4.8**. Raleigh, 1997-2001. 1 arquivo (11,5M); Disponível em <<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>> BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT.

HAMMOND, S.M. Dicing and slicing - the core machinery of the RNA interference pathway. **FEBS Letters**, v. 579, p. 5822-5829, 2005.

HAMMOND, T.M.; ANDREWSKI, M.D.; ROOSSINCK, M.J.; KELLER, N.P. *Aspergillus* mycoviruses are targets and suppressors of RNA silencing. **Eukaryotic Cell**. v. 7, p. 350-357, 2008.

HERBERT, J.A., GRECH, N.M. A strain of *Guignardia citricarpa*, the citrus black spot pathogen, resistant to benomyl in South Africa. **Plant Disease**, St. Paul, v. 69, p. 1007, 1985.

HILLMAN, B.I., SUPYANI, S., KONDO, H., SUZUKI, N., A reovirus of the fungus *Cryphonectria parasitica* that is infectious as particles and related to the coltivirus genus of animal pathogens. **Journal of Virology**, 78, 892-898, 2004.

HOLLINGS, M. Viruses associated with dieback disease of cultivated mushrooms. **Nature** (London) 196, 962-965, 1962.

HOWARD, R.J.; FERRARI, M.A. Role of melanin in apressorium function. **Experimental Mycology**, Orlando, v.13, p. 403-418, 1989.

HUANG, S., GHABRIAL, S.A., Organization and expression of the double-stranded RNA genome of *Helminthosporium victoriae* 190S virus, a totivirus infecting a plant pathogenic filamentous fungus. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, 22, 12541-12546, 1996.

IBRAHIM, G.; BAYCA, B. Fungal, bacterial and nematological problems of citrus, grape and stone fruits in Arab countries. **Arab Journal of Plant Protection**, Beirut, v.7, n.2, p.190-197, 1989.

IGLESIA, F., ELENA, S.F., Fitness declines in *Tobacco Etch Virus* upon serial bottleneck transfers. **Journal of Virology**, 81, 4941-4947, 2007.

IHRMARK, K., ZHENG, J., STENSTROM, E., STENLID, J., Presence of double-stranded RNA in *Heterobasidium annosum*. **Forest Pathology**, 31, 387-394, 2001.

IHRMARK, K.; JOHANNESON, H.; STENSTROM, E.; STENLID, J. Transmission of double-stranded RNA in *Heterobasidium annosum*. **Fungal Genetics and Biology**. v.36, p. 147–154, 2002.

IKEDA, K., NAKAMURA, H., MATSUMOTO, N. Comparison between Rosellinia necatrix isolates from soil and diseased roots in terms of hypovirulence. **FEMS Microbiology Ecology**, 54:307-315, 2005.

JOHNSTON, P.R.; FULLERTON, R.A. *Cryptosporiopsis citri* sp. Nov., cause of a citrus leal spot in the Pacific Islands. **New Zealand Journal of Experimental Agriculture**, Wellington, v.16, p.159-163, 1988.

KILIC, O. Effect of dsRNA-containing and dsRNA-free hypovirulent isolates of *Fusarium oxysporum* on severity of Fusarium seedling disease of Essex soybean. Blacksburg, Virginia, EUA, 1998. Orientador: Gary Griffin. Faculty of the Virginia Polytechnique Institute and State University.

KOONIN, E. V. Evolution of double-stranded RNA viruses: a case for polyphyletic origin from different groups of positive-stranded RNA viruses. **Sem. Virol.** 3. 327 - 339, 1992

KOZLAKIDIS, Z. COVELLI, L., DI SERIO, F., CITIR, A., AÇIKGÖZ, S., HERNÁNDEZ, C., RAGOZZINO, A., FLORES, R., COUTTS, R.H.A., 2006. Molecular characterization of the largest mycoviral-like double-stranded RNAs associated with Amasya cherry disease, a disease of presumed fungal aetiology. **Journal of General Virology**, 87, 3113-3117, 2006.

KUBO, Y.; TAKAMO, Y.; ENDO, N.; YASUDA, N.; TAJIMA, S.; FURUSAWA, I. Cloning and structural analysis of the melanin biosynthesis gene SCD1 encoding

scytalone dehydratase in *Colletotrichum lagenarium*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 62, n. 12, p. 4340-4344, 1996.

LARKIN, M.A., BLACKSHIELDS, G., BROWN N.P., CHENNA R., MCGETTIGAN P.A., MCWILLIAM H., VALENTIN F., WALLACE I.M., WILM A., LOPEZ R., THOMPSON J.D., GIBSON T.J., HIGGINS D.G. Clustal W and Clustal X version 2.0. **Bioinformatics**, 23, 2947-2948, 2007.

LEUCHTMANN, A.; PETRINI, O.; PETRINI, L.E.; CARROLL, G.C. Isozyme polymorphism in six endophytic *Phyllosticta* species. **Mycological Research**, Cambridge, v.96, n. 4, p. 287-294, 1992.

LIM, W.S.; JEONG, J. H.; JEONG, R. D.; YOO, Y. B.; YIE, S.W.; KIM, K.W. Complete nucleotide sequence and genome organization of a dsRNA partitivirus infecting *Pleurotus ostreatus*. **Virus Research**, v.108, p. 111–119, 2004.

LIU, H., FU, Y., JIANG, D., **National Center for Biotechnology Information**, NIH, Bethesda, MD 20894, USA, 2009.

LIU, W., CHEN, J., XUE, F., ZENG, R., Genomic characterization of a novel partitivirus infecting *Aspergillus ochraceus*. **Virus Genes**, 37, 322-327, 2008.

MADDISON, W. P., MADDISON, D. R. Mesquite: A Modular System for Evolutionary Analysis, v. 2.72. 2009

MAEJIMA, K.; HIMENO, M.; KOMATSU, K.; KAKIZAWA, S.; YAMAJI, Y.; HAMAMOTO, H.; NAMBA, S. Complete nucleotide sequence of a new double-stranded RNA virus from the rice blast fungus, *Magnaporthe oryzae*. **Archives of Virology**, v. 153, p. 389-391, 2008.

MAOR, R.; PUYESKY, M.; HORWITZ, B.A.; SHARON, A. Use of green fluorescent protein (GFP) for studying development and fungal-plant interaction in *Cochliobolus heterostrophus*. **Mycological Research**, Cambridge, v. 102, n. 4, p. 491-496, 1998.

McONIE, K.C. Source of inoculum of *Guignardia citricarpa*, the citrus black spot pathogen. **Phytopathology**, St. Paul, v.54, p.64-67, 1964b.

McONIE, K.C. The latent occurrence in citrus and other hosts of a *Guignardia* easily confused with *G. citricarpa*, the citrus black spot pathogen. **Phytopathology**, St. Paul, v.54, p.40-43, 1964a.

MEISTER, G.; TUSCHL, T. Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA. **Nature**, v. 431, p. 343-349, 2004.

MERTENS, P. The dsRNA viruses. **Virus Research**, Shannon, v. 101, p. 3-13, 2004.

NOGAWA, M., KAGEYAMA, T., NAKATANI, A., TAGUCHI, G., SHIMOSAKA, M., OKAZAKI, M., Cloning and characterization of mycovirus double-stranded RNA from the plant pathogenic fungus, *Fusarium solani*. **Biosci.Biotechnol. Biochem.** 60, 784-788, 1996.

NUSS, D. Hypovirulence - mycoviruses at the fungal-plant interface. *Nature Reviews Microbiology*, 3:632-642, 2005.

OKANE, I.; NAKAGIRI, A.; ITO, T. Identity of *Guignardia* sp. Inhabiting ericaceous plants. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 79, p.101, 2001.

OSAKI, H.; NOMURA, K.; IWANAMI, T.; KANEMATSU, S.; OKABE, I.; MATSUMOTO, N.; SASAKI, A.; OHTSU, Y. Detection of a double-stranded RNA virus from a strain of the violet root rot fungus *Helicobasidium mompa* Tanaka. **Virus Genes**, v.25, p.139-145, 2004.

PANDEY, A.K.; REDDY, M.S.; SURYANARAYANAN, T.S. ITS-RFLP and ITS sequence analysis of a foliar endophytic *Phyllosticta* from different tropical trees. **Mycological Research**, Cambridge, v.107, n.4, p.439-444, 2003.

PARK, Y., JAMES, D., PUNJA, Z.K. Co-infection by two distinct totivirus-like double-stranded RNA elements in *Chalara elegans* (*Thielaviopsis basicola*). **Virus Research**, 109, 71-85, 2004.

PARK, C.M., BERNEJEE, N., KOLTIN, Y., BRUENN, J.A. The *Ustilago maydis* virally encoded KP1 killer toxin. **Molecular Microbiology**, 20, 957 - 963, 1996.

PATEL, B.N.; PATEL, R.C.; TILVA, D.G. *Phyllosticta* leaf spot: a new disease in Bidi tobacco nursey. **Tobacco Research**, Rajahmundry, v.14, p. 1176-1178, 1988.

PENNA, E.B.S. **Microrganismos endofíticos de erva-mate (*Ilex paraguariensis*) e variabilidade genética em *Phyllosticta* sp por RAPD.** Curitiba, 2000, 12p. Dissertação (Mestrado). Orientador: Prof. Dr. João Lúcio de Azevedo. Universidade Federal do Paraná.

PETRINI, O. Fungal endophytic of tree leaves. In: ANDREWS, J.; HIRANO, S.S. (Eds.). **Microbial ecology of leaves**, Spring Verlag, 1991, p. 179-197.

PETRINI, O. Taxonomy of endophytic fungi of aerial plant tissues. In: FOKKEMA, N.J.; HEUVEL, J. VAN DEN (Eds.), **Microbiology of the Phyllosphere**, Cambridge, U.K. Cambridge University Press, p. 175 -187. 1986.

POCH, O.; SAUVAGET, M.D.; TORDO, N. Identification of four conserved motifs among the RNA-dependent polymerase encoding elements. **The EMBO Journal**. v.8, p.3867-3874, 1989.

PONS, N. Estudio taxonomico de especies de *Phoma* y *Phyllosticta* sobre caña de azucar (*Saccharum* sp). **Fitopatologia Venezolana**, Maracay, v.3, p.34-43, 1990.

PONTECORVO, G.; ROPER, J.A.; HEMMONS, L.M.; MaC DONALD, K.D.; BUFTON, A.W.J. The genetics of *Aspergillus nidulans*. **Advances in Genetics**, San Diego, v. 5, p. 141

PILEGGI, S.A.V., OLIVEIRA, S.F.V., ANDRADE, C.W., VICENTE, V.A., DALZOTO, P.R., CRUZ, G.K., GABARDO, J., MASSOLA JR., N.S., TOZZE JR., H.J., PILLEGI, M., KAVA-CORDEIRO, V., GALLI-TERASAWA, L.V., PIMENTEL, I.C., STRINGARI, D., GLIENKE, C. Molecular and morphological markers for rapid distinction between 2 *Colletotrichum* species. **Canadian Journal of Microbiology**, 55, 1076-1088, 2009.

POSSIEDE, Y.M., GABARDO, J., KAVA-CORDEIRO, V., GALLI-TERASAWA, L.V., AZEVEDO, J.L., GLIENKE, C. Fungicide resistance and genetic variability in plant pathogenic strains of *Guignardia citricarpa*. **Brazilian Journal of Microbiology**, 40, 308-313, 2009.

PREISIG, O., WINGFIELD, B.D., WINGFIELD, M.J., Coinfection of a fungal pathogen by two distinct double-stranded RNA viruses. **Virology**, 252, 399-406, 1998.

PREISIG, O.; MOLELEKI, N.; SMIT, W.A.; WINGFIELD, B.D.; WINGFIELD, M.J. A novel RNA mycovirus in a hypovirulent isolate of the plant pathogen *Diaporthe ambigua*. **Journal of General Virology**, v.81, p. 3107–3114, 2000.

QIU, L., LI, Y., LIU, Y., 2009. Particle and naked RNA mycoviruses in China Industrial cultivated mushroom *Pleurotus ostreatus*. **Unpublished**.

RAEDER, U.; BRODA, P. Rapid preparation of DNA from filamentous fungi. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 1, p. 17-20, 1985.

RATTI, G.; BUCK, K.W. Semi-conservative transcription in particles of a double-stranded RNA mycovirus. **Nucleic Acids Research**. v.5, pg 3843-3854, 1978.

REHFELDT, K., SCHMITT, M.J. 2000. ZbV-Z a new dsRNA-virus in *Zygosaccharomyces bailii*. Angewandte Molekularbiologie, **Universitt des Saarlandes**, Germany, 2000.

ROBBS, C. F. A mancha preta dos frutos cítricos (*Phyllosticta citricarpa*): ameaça a citricultura paulista. **Laranja**, Cordeirópolis, v. 11, n. 1, p. 75-86, 1990.

ROBBS, C. F.; BITTENCOURT, A. M. A mancha preta dos frutos: um dos fatores limitantes à produção citrícola do estado do Rio de Janeiro. **Comunicado Técnico – CTAA-EMBRAPA**, n. 19, p. 1-5, 1995.

ROBBS, C. F.; PIMENTEL, J. P.; RIBEIRO, R. L.D. A mancha preta causada por *Phoma citricarpa*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 5, p. 455, 1980.

ROMO, M.; LEUCHTMANN, A.; GARCÍA, B.; ZABALGOGEAZCOA, I. A totivirus infecting the mutualistic fungal endophyte *Epichlœ festucae*. **Virus Research**, United Kingdom, v 124, p. 38-43, 2006.

RONG, R., RAO, S., SCOTT, S.W., CARNER, G.R., TAINTER, F.H., Complete sequence of the genome of two dsRNA viruses from *Discula destructiva*. **Virus Research** 90, 217-224, 2002.

SALOMÃO, Alexa. Os Concorrentes Viraram Suco. **Exame**, edição 893, 23 de maio de 2007.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F. and MANIATIS, T. **Molecular Cloning: a laboratory manual**. 2nd ed. N.Y., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 1659 p. ISBN 0-87969-309-6.

SASAKI, A., MIYANISHI, M., OZAKI, K., ONOUE, M., YOSHIDA, K., Molecular characterization of a partitivirus from the plant pathogenic ascomycete *Rosellinia necatrix*. **Archives of Virology**, 150, 1069-1083, 2005.

SEGBERS, G.C.; ZHANG, X.; DENG, F.; SUN, Q.; NUSS, D.L. Evidence that RNA silencing functions as an antiviral defense in mechanism in fungi. **Proceedings in the National Academy of Science**. v. 104, p. 12902-12906, 2007.

SHAPIRA, R., NUSS, D.L., Gene expression by a hypovirulence-associated virus of the chestnut blight fungus involves two papain-like protease activities. **J. Biol. Chem.** 266, 19419-19425, 1991.

SILVA, F. A. S. ASSISTAT Assistência em Estatística. Versão 7.5 beta (2010).

SILVA, T. M., RNA dupla-fita em *Guignardia citricarpa* E ESTIMATIVA DO NÚMERO DE CROMOSSOMOS EM *G. citricarpa*, *G. mangiferae* E *Phyllosticta spinarum*. Dissertação (Mestrado), Curitiba, UFPR, 2008. Orientador: Prof. Dra. Chirlei Glienke. Universidade Federal do Paraná.

SILVANO, C. Investigação e caracterização de RNA dupla fita em *Guignardia citricarpa* e *Phyllosticta spinarum*. Início: 2008. Iniciação científica (Graduando em Ciências Biológicas) - Universidade Federal do Paraná

SIVANESAN, A. Graminicolous species of *Bipolaris*, *Curvularia*, *Dreschslera*, *Exserohilum* and their teleomorphos. *Mycological Papers* 158: 1-261, 1987.

SHAW, B.D.; KUO, K.; HOCH, H.C. Germination and apressorium development of *Phyllosticta ampellicida* pycnidiospores. **Mycologia**, Lawrence, v.90, n.2, p. 258-268, 1998.

SOLDEVILA, A.I., HAVENS, W.M., HUANG, S., GHABRIAL, S.A., Molecular characterization of *Helminthosporium victoriae* 145S viral dsRNA segments 2, 3 and 4. **Plant Pathology**, University of Kentucky, 2004.

SOLOMON, P.S.; TAN, K.; OLIVER, R.P. The nutrient supply of pathogenic fungi; a fertile field for study. **Molecular Plant Pathology**, Oxford, v. 4, n. 3, p. 203-210, 2003.

SPÓSITO, M.B.; AGUILAR-VILDOSO, C.I.;MORAES. M. R.; FEICHTENBERGER, E.; RUBIM, C.A. Avaliação de tratamentos fungicidas da mancha preta em frutos de laranja 'Natal'. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v.24, p. 334, 1999.

STRAUSS, E.E., LAKSHMAN, D.K., TAVANTZIS, S.M., Molecular characterization of the genome of a partitivirus from the basidiomycete *Rhizoctania solani*. **Journal of General Virology**, 81, 549-555, 2000.

STRINGARI, D., GLIENKE, C., CHRISTO, D., MACCHERONI JR., WALTER, AZEVEDO, J.L., High molecular diversity of the fungus *Guignardia citricarpa* and *Guignardia mangiferae* and new primers for the diagnosis of the Citrus Black Spot. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 52, 1063-1073, 2009.

SUGHA, S.K.; SINGH, B.M.; SHARMA, B.M. Studies on *Phyllosticta glumarum* causing glume blight of rice (*Oryza sativa* L.) **Himachal Journal of Agricultural Research**, Palampur, v.12, n.1, p. 11-14, 1986.

SUZAKI, K. *Helicobasidium mompa* dsRNA. National Institute of Fruit Tree Science, **Plant Pathology**, 2006.

SWEENEY, T.K.; TATE, A.; FINK, G.L. A study of the transmission of double-stranded RNAs associated with the killer phenomenon in *Saccharomyces cerevisiae*. **Genetics** V. 84, p. 27-42 September, 1976.

SWOFFORD, D. L. PAUP*: Phylogenetic Analysis Using Parsimony (and Other Methods) 4.0 Beta. Florida State University, 2002.

TAMURA, K., DUDLEY, J., NEI, M., KUMAR, S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) Software Version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*, 24:1596-1599, 2007.

TAYLOR, D. J., BRUENN, J. The evolution of novel fungal genes from non-retroviral RNA viruses. **BMC Biology**: 7:88, 2009

TUOMIVIRTA, T.T., HANTULA, J. Three unrelated viruses occur in a single isolate of *Gremmeniella abietina* var. *abietina* type A. **Virus Research**. 110, 31-39, 2005.

VAN DER AA, H.A. Studies in *Phyllosticta* I. **Studies in Mycology**, n.5, 1973.

VAN DER LENDE, T.R., DUITMAN, E.H., GUNNEWIJK, M.G., YU, L., WESSELS, J.G., Functional analysis of dsRNAs (L1, L3, L5 and M2) associated with isometric 34-nm virions of *Agaricus bisporus* (white button mushroom). **Virology**, 217, 88-96, 1996.

WEI, C.Z., OSAKI, H., IWANAMI, T., MATSUMOTO, N., OHTSU, Y., Complete nucleotide sequences of genome segments 1 and 3 of *Rosellinia* anti-rot virus in the family Reoviridae. **Archives of Virology**, 149, 773-777, 2004.

WESOLOWSKI, M.; WICKNER, R.B. Two new double-stranded RNA molecules showing non-mendelian inheritance and heat inducibility in *Saccharomyces cerevisiae*. **Molecular and Cellular Biology**, v.4, p.181-187, 1984.

WICKNER, R.B., GHABRIAL, S.A., BRUENN J.A., BUCK K.W., PATTERSON, J.L., STUART, K.D., WANG, C.C. Virus taxonomy Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Academic Press, San Diego, California, 491-501, 2000.

WOLOSHUK, C.P.; SISLER, H.D. Tricyclazole, pyroquilon,

tetrachlorophthalide, PCBA, coumarine and related compounds inhibit melanization and epidermal penetration by *Pyricularia oryzae*. **Journal of Pesticide Science**, Tokyo, v. 7, p. 161-166, 1982.

XIE, J.; WEI, D.; JIANG, D.; FU, Y.; LI, G.; GHABRIAL, S.; PENG, Y. Characterization of debilitation-associated mycovirus infecting the plant-pathogenic fungus *Sclerotinia sclerotiorum*. **Journal of General Virology**, v. 87, 241–249, 2006.

YOKOI, T., YAMASHITA, S., HIBI, T., The nucleotide sequence and genome organization of *Magnaporthe oryzae* virus 1. **Archives of Virology**. 152, 2265-2269, 2007.

ZACOMMER, B., HAENNI, A., e MACAYA, G. The remarkable variety of plant RNA virus genomes. **Journal of General Virology**, 76, 231-247, 1995.

ZHANG, L., CHURCHILL, A. C. L., KAZMIERCZAK, P., KIM, D. H., ALFEN, N. K. V. Hypovirulence-associated traits induced by a mycovirus of *Cryphonectria parasitica* are mimicked by targeted inactivation of a host gene. **Molecular and Cellular Biology**, v. 13, p. 7782-7792, 1993.

ZHANG, X.; SEGERS, G.C.; SUN, Q.; DENG, F.; NUSS, D.L. Characterization of hypovirus-derived small RNAs generated in the Chestnut Blight Fungus by and inducible DCL-2-Dependent pathway. **Journal of Virology**. v. 82, p. 2613-2619, 2008.

APÊNDICES

APÊNDICE 1 – ANOVA E TESTE DE MÉDIAS (PROGRAMA ASSISTAT) DO ISOLADO ECLaP E SEUS SETORES QUANTO AO CRESCIMENTO MICELIAL EM MC APÓS 15 DIAS.

EXPERIMENTO INTEIRAMENTE CASUALIZADO

F.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Tratamentos	5	22.35667	4.47133	3.2369*
Resíduo	24	33.15300	1.38138	
Total	29	55.50967		

* significativo ao nível de 5% de probabilidade ($0.01 \leq p < 0.05$)

GL: 5, 24 F-krit(5%) = 2.6207 F = 3.2369 p = .02253

TESTE DAS MÉDIAS

ECLaP 1	4.38	A	
ECLaP 2	4.08	A	
ECLaP	3.42	A	B
ECLaP 3	3.39	A	B
ECLaP 4	2.75	A	B
ECLaP 5	1.76		B

DMS = 2.29695; MG = 3.29667; CV% = 35.65174

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

APÊNDICE 2 – ANOVA E TESTE DE MÉDIAS (PROGRAMA ASSISTAT) DA LINHAGEM PC7LD6 E SEUS SETORES QUANTO AO CRESCIMENTO MICELIAL EM MC APÓS 15 DIAS.

EXPERIMENTO INTEIRAMENTE CASUALIZADO

F.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Tratamentos	6	45.83786	7.63964	18.6090 **
Resíduo	28	11.49500	0.41054	
Total	34	57.33286		

** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < 0.01$)

GL: 6, 28 F-krit(1%) = 3.5276 F = 19.3177 $p < 0.00100$

TESTE DAS MÉDIAS

PC7LD6 1	5.89	A				
PC7LD6 2	4.90	A	B			
PC7LD6 3	4.20		B		D	
PC7LD6 4	3.73		B	C	D	
PC7LD6 5	3.42			C	D	E
PC7LD6 6	2.76				D	E
PC7LD6	2.30					E

DMS = 1.28453; MG = 3.88571; CV% = 16.48939

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

APÊNDICE 3 – ANOVA E TESTE DE MÉDIAS (PROGRAMA ASSISTAT) DA LINHAGEM FTMi2.5 E ISOGÊNICAS QUANTO AO CRESCIMENTO MICELIAL EM MC APÓS 15 DIAS.

EXPERIMENTO INTEIRAMENTE CASUALIZADO

F.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Tratamentos	3	8.27666	2.75889	20.4540**
Resíduo	16	2.15812	2.15812	
Total	19	10.43478		

** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < 0.01$)

GL: 3, 16 F-krit(1%) = 5.29; F = 20.4540 $p < 0.001$

TESTE DAS MÉDIAS

FTMi2.5	3.22	A	
FTMi2.5 A	1.98		B
FTMi2.5 B	1.83		B
FTMi2.5 C	1.534		B

DMS = 0.66519; MG = 2.1410; CV% = 17.15383

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

APÊNDICE 4 – ANOVA E TESTE DE MÉDIAS (PROGRAMA ASSISTAT) DA LINHAGEM FTMi3.1E ISOGENICA QUANTO AO CRESCIMENTO MICELIAL EM MC APÓS 15 DIAS.

EXPERIMENTO INTEIRAMENTE CASUALIZADO

F.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Tratamentos	1	1.024	1.024	5.9535*
Resíduo	8	1.376	0.172	
Total	9	2.4		

* significativo ao nível de 5% de probabilidade ($0.01 \leq p < 0.05$)

GL: 1, 8 F-krit(1%) = 5.3177 ; F = 5.9535 p = 0.4057

TESTE DAS MÉDIAS

FTMi3.1	2.47	A	
FTMi3.1 A	1.83		B

DMS = 0.60464; MG = 2.15; CV% = 28.971

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

APÊNDICE 5 – ANOVA E TESTE DE MÉDIAS (PROGRAMA ASSISTAT) DA LINHAGEM FTMi7.1E ISOGÊNICA QUANTO AO CRESCIMENTO MICELIAL EM MC APÓS 15 DIAS.

EXPERIMENTO INTEIRAMENTE CASUALIZADO

F.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Tratamentos	1	2.97025	2.97025	10.5515*
Resíduo	8	2.25200	0.28150	
Total	9	5.22225		

* significativo ao nível de 5% de probabilidade ($0.01 \leq p < 0.05$)

GL: 1, 8 F-krit(1%) = 5.3177 ; F = 10.5515 p = 0.1173

TESTE DAS MÉDIAS

FTMi7.1	3.39	A	
FTMi7.1 A	2.30		B

DMS = 0.77352; MG = 2.845; CV% = 18.64906

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

APÊNDICE 6 – ANOVA E TESTE DE MÉDIAS (PROGRAMA ASSISTAT) DA LINHAGEM FTP11.3 E ISOGÊNICAS QUANTO AO CRESCIMENTO MICELIAL EM MC APÓS 15 DIAS.

EXPERIMENTO INTEIRAMENTE CASUALIZADO

F.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Tratamentos	2	1.58433	0.79217	15.8433**
Resíduo	12	0.60000	0.50000	
Total	14	2.18433		

** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < 0.01$)

GL: 2, 12 F-krit(1%) = 6.9266 ; F = 15.8433 $p < 0.001$

TESTE DAS MÉDIAS

FTP11.3	2.30	A	
FTMi11.3 A	2.21	A	
FTMi11.3 B	1.57		B

DMS = 0.377; MG = 2.02667; CV% = 11.03323

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.